



Titre: Microparticules magnétiques thérapeutiques pour la chimio-
Title: embolisation ciblée du foie

Auteur: Pierre Pouponneau
Author:

Date: 2011

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Pouponneau, P. (2011). Microparticules magnétiques thérapeutiques pour la
Citation: chimio-embolisation ciblée du foie [Thèse de doctorat, École Polytechnique de
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/522/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/522/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Sylvain Martel, & Jean-Christophe Leroux
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MICROPARTICULES MAGNÉTIQUES THÉRAPEUTIQUES POUR LA
CHIMIO-EMBOLISATION CIBLÉE DU FOIE

PIERRE POUPONNEAU

INSTITUT DU GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

MARS 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

MICROPARTICULES MAGNÉTIQUES THÉRAPEUTIQUES POUR LA CHIMIO-
EMBOLISATION CIBLÉE DU FOIE

présentée par: POUPONNEAU Pierre

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., présidente

M. MARTEL Sylvain, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. LEROUX Jean-Christophe, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

Mme TABRIZIAN Maryam, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je remercie le Prof. Sylvain Martel de m'avoir permis de réaliser ce doctorat dans son laboratoire et pour sa confiance tout au long du projet.

Je remercie le Prof. Jean-Christophe Leroux de m'avoir accepté dans son laboratoire, pour son intérêt et ses judicieux conseils.

Je remercie les membres du jury: Prof. Hoemann, Prof. Tabrizian, et Prof. Jolicoeur d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie les membres du laboratoire de Nanorobotique pour leur intérêt et leur participation à la réalisation de cette thèse. Je remercie particulièrement Charles Tremblay pour son aide pour la fabrication des modèles de l'artère hépatique, Jean-Baptiste Mathieu et Gaël Bringout pour leur aide avec le guidage *in vitro* et *in vivo*.

Je remercie les membres du laboratoire du Prof. Leroux pour leur accueil, leur sympathie, et leurs conseils. Je remercie particulièrement Jeanne Leblond, Nicolas Bertrand et Jean-Philippe Sylvestre pour les lectures attentionnées des articles.

Je remercie Jean-Philippe Masse (Centre de caractérisation microscopique des matériaux (CM)²), École Polytechnique de Montréal (EPM)) pour les images électroniques des microparticules et des nanoparticules dans les meilleurs délais et pour son intérêt au projet, le Prof. David Ménard (EPM) pour l'accès au magnétomètre à échantillon vibrant, Carole Massicotte (EPM) pour l'accès au four pour le recuit des nanoparticules, Sylvie Marceau and Amira Khoury (Université de Montréal (UDM)) pour l'accès et l'utilisation du spectromètre d'absorption atomique.

Je remercie le Dr. Soulez (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)) pour son aide et sa participation aux expériences *in vivo*, Jocelyne Lavoie (CHUM) pour la coordination des expériences *in vivo*, Gilles Beaudoin (CHUM) pour son aide avec le système d'IRM, Dr. Hélène Héon (CHUM) et l'équipe de l'animalerie du CHUM pour leur intérêt et leur aide pour les expériences *in vivo*.

Je remercie le Dr. Louis Gaboury (UDM) pour son aide pour l'analyse histologique du foie, Julie Hinsinger (UdM) et l'équipe d'histologie (UdM) pour la préparation des tissus et leur intérêt au projet.

Je remercie très chaleureusement mes amis, ma douce et ma famille pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette thèse.

RÉSUMÉ

Cette thèse présente un vecteur thérapeutique pour le traitement des tumeurs du foie basé sur une nouvelle méthode de ciblage magnétique. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer le plus fréquent dans le foie. Il est la troisième cause de mortalité reliée à un cancer. Sa fréquence augmente à travers le monde et le pronostic reste sombre (mortalité dans les 3 à 6 mois) malgré de multiples recherches. Environ 70 % des patients ne peuvent recevoir que des traitements palliatifs et la chimio-embolisation demeure l'approche la plus efficace. Cette procédure combine deux techniques: la chimiothérapie avec l'injection par cathéter d'un agent anticancéreux et l'embolisation des vaisseaux sanguins par des microparticules provoquant une ischémie de la tumeur. Afin de maximiser son efficacité et de limiter ses effets secondaires, ce traitement doit être ciblé au niveau de la tumeur. Cependant, le ciblage est actuellement limité par le positionnement du cathéter à plusieurs bifurcations des vaisseaux sanguins en amont de la tumeur. Comme la distribution des agents chimio-embolisants n'est pas contrôlée, il en résulte une atteinte des cellules saines.

La navigation par résonance magnétique ('magnetic resonance navigation' (MRN)) a été récemment proposée comme une nouvelle méthode de ciblage magnétique des tumeurs. Elle consiste à contrôler la direction d'un corps ferromagnétique en temps réel selon une trajectoire prédéterminée dès son injection dans un réseau vasculaire jusqu'à la zone d'intérêt grâce à un appareil d'imagerie par résonance magnétique (IRM). La navigation dépend du gradient magnétique, du volume et de la magnétisation à saturation (M_s) du dispositif thérapeutique ainsi que des paramètres physiologiques du réseau vasculaire ciblé. Deux bobines de gradient de 400 mT m^{-1} sont placées dans l'IRM afin de guider des corps à l'échelle micrométrique.

L'hypothèse de recherche de cette thèse est qu'il est possible de réaliser un vecteur thérapeutique compatible avec les contraintes de la chimio-embolisation du foie et de la MRN au niveau de l'artère hépatique pour cibler les lobe gauche/droit du foie. Ce vecteur, appelé 'therapeutic magnetic microcarriers' (TMMC), est chargé avec un agent anticancéreux et des

nanoparticules magnétiques. Il a été conçu en prenant en considération les paramètres physiologiques du lapin, modèle animal choisi pour évaluer la MRN *in vivo*.

Une étude de conception, basée sur une modélisation mathématique du guidage et une revue de littérature sur la chimio-embolisation, a été réalisée pour déterminer les propriétés des TMMC (diamètre, Ms, choix et chargement en nanoparticules). Des nanoparticules fer-cobalt (FeCo) ont été synthétisées par voie chimique puis recuites en atmosphère inerte afin d'optimiser leurs propriétés magnétiques. Ces nanoparticules ferromagnétiques avaient un diamètre moyen de 200 nm, déterminé en microscopie électronique en transmission, et une Ms de 205 emu g⁻¹, mesurée avec un magnétomètre à échantillon vibrant. Grâce à leur grande Ms, ces nanoparticules ont permis de réduire presque de moitié le chargement en matériau magnétique dans les TMMC par rapport à l'encapsulation de nanoparticules d'oxyde de fer. Les nanoparticules étaient recouvertes d'une couche de graphite de 10 nm les protégeant de l'oxydation et permettant ainsi de conserver leurs excellentes propriétés magnétiques. L'étude de conception a été validée par l'encapsulation des nanoparticules FeCo dans des microparticules biodégradables de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) guidées *in vitro* dans un modèle de l'artère hépatique avec sa bifurcation gauche/droite. L'efficacité de guidage a été évaluée par l'analyse des vidéos de guidage et le dosage du fer et du cobalt par spectrométrie d'absorption atomique dans chaque bifurcation.

Les nanoparticules FeCo ont été ensuite co-encapsulées avec de la doxorubicine (DOX) dans des microparticules de PLGA. La DOX est un agent anticancéreux très employé pour le traitement du CHC. Les TMMC avaient un diamètre moyen de 52 µm, une Ms de 72 emu g⁻¹ et elles étaient chargées à 37% (*m/m*) en nanoparticules FeCo et en DOX à 3% (*m/m*). *In vitro*, après 3 jours d'élution dans une solution tampon de phosphate de sodium, il restait 54% de la DOX encapsulée. L'élution se caractérisait par une libération rapide sur une heure puis un ralentissement de sa cinétique.

Le guidage des TMMC a été évalué *in vitro* dans un modèle d'artère hépatique dans des conditions physiologiques et de radiologie interventionnelle (injection avec un cathéter, distance

entre le cathéter et la bifurcation variant entre 30 et 20 mm, gradient entre 200 et 400 mT m⁻¹, vitesse d'écoulement entre 7,5 et 12 cm s⁻¹). L'efficacité de guidage était définie comme la réduction par la MRN de la quantité de microparticules dans la zone non ciblée par rapport au contrôle négatif (sans guidage). Cette efficacité illustre le potentiel de la MRN à préserver les tissus sains des TMMC. L'efficacité de guidage a été maximisée en augmentant le gradient. Elle a diminué plus le cathéter était proche de la bifurcation et plus la vitesse du flot augmentait. Aussi, elle a diminué avec des microparticules ayant des propriétés de guidage moindres (diamètre de 30 µm et Ms = 49 emu g⁻¹). Ce résultat confirma que les propriétés des TMMC devaient correspondre aux caractéristiques du réseau vasculaire ciblé. Dans les conditions optimales, l'efficacité de guidage atteint 70 %.

Le guidage des TMMC a été évalué *in vivo*. Un protocole de radiologie interventionnelle compatible avec la MRN a été mis au point pour placer les cathéters, réduire la vitesse sanguine pendant le guidage et déterminer les paramètres des séquences d'imagerie. Les TMMC ont générés des pertes de signal sur les images IRM en T2* en raison de leur grande magnétisation. Ceci permit leur localisation dans les tissus. L'embolisation des branches de l'artère hépatique par les TMMC a été confirmée par des analyses histologiques. La libération progressive de la DOX a été vérifiée en mesurant sa concentration plasmatique. La distribution des microparticules dans le tissu a été déterminée par des analyses histologiques et les mesures des concentrations de DOX et de cobalt. Une différence significative dans la distribution des TMMC dans les lobes a été obtenue entre le groupe avec et sans guidage. Ainsi, la MRN a permis de diminuer la concentration des microparticules dans la zone non ciblée. Dans les conditions optimales de la MRN, l'efficacité de guidage atteint 50 %. Les paramètres affectant l'efficacité de guidage *in vitro* ont été confirmés lors des essais *in vivo*.

Le guidage de ces microparticules permettrait de diminuer les effets secondaires de la chimio-embolisation chez des patients avec des fonctions du foie diminuées et un pronostic vital sombre. Les travaux suivants porteront sur l'évaluation de la MRN à travers plusieurs bifurcations et de l'efficacité thérapeutique des TMMC.

ABSTRACT

The proposed project introduces a therapeutic vector for the liver tumor treatment based on a new magnetic targeting strategy. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver tumor and it is the third cause of cancer-related death. The incidence of HCC is increasing worldwide and its prognostic remains poor (death within 3 to 6 months) despite intensive researches. Approximately 70% of the patients can receive only palliative treatments and chemoembolization is the most efficient approach. This intervention combines two treatment modalities: the chemotherapy with the injection of an antitumor drug, and the embolization of the blood vessels with microparticles, inducing an ischemia of the tumor. To optimize the efficiency and to reduce the secondary effects, this treatment should be targeted on the tumor. However, this targeting is actually limited by the placement of the catheter used for the injection of the cytotoxic agent in the blood vessels at several bifurcations upstream of the tumor. Since the distribution of the chemoembolizing agent cannot be controlled, healthy cells are also affected by the treatment.

Magnetic resonance navigation (MRN) has been recently proposed as a new method for the magnetic targeting of tumors. This method aims at controlling the direction of a ferromagnetic body in real time along a pre-planned trajectory from its release in the vascular network to the region of interest with a magnetic resonance imaging (MRI) scanner. MRN depends on the magnetic gradient, the volume and the saturation magnetization (M_s) of the therapeutic device and the physiological properties of the vascular network being targeted. An insert of gradient coils of 400 mT m^{-1} is placed in the MRI system to steer micro scale devices.

The hypothesis of this thesis is that it is possible to design a therapeutic vector compatible with the constraints of liver chemoembolization and MRN in the hepatic artery to target the right/left lobe of the liver. This vector, referred to as therapeutic magnetic microcarriers (TMMC) is loaded with an antitumor drug and magnetic nanoparticles. It was designed by taking into

consideration the rabbit physiological parameters, the rabbit being the animal model chosen for the *in vivo* MRN experiments.

A design study, based on a mathematical modeling of microparticle steering and a literature review on the chemoembolization, was done to optimize TMMC properties (diameter, Ms, nanoparticle choice and loading). Iron-cobalt (FeCo) nanoparticles were synthesized and annealed under inert conditions to improve their magnetic properties. These ferromagnetic nanoparticles possessed a mean diameter of 200 nm, measured by transmission electronic microscopy, and an Ms of 205 emu g⁻¹, determined with a vibrating sample magnetometer. These nanoparticles, by their high Ms, allowed reducing by half the magnetic material loading in TMMC compared with the encapsulation of iron oxide nanoparticles. The nanoparticles coated with 10-nm graphite shell were protected from oxidation and thus they maintained their excellent magnetic properties. The design study was experimentally confirmed by the encapsulation of FeCo nanoparticles into poly(lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) biodegradable microparticles. The latter were steered *in vitro* in a phantom mimicking the hepatic artery and its right/left bifurcation. The steering efficiency was determined by steering video analysis and the iron and cobalt ion concentrations were assayed by atomic absorption spectrometry in each bifurcation.

FeCo nanoparticles were then co-encapsulated with doxorubicin (DOX) into PLGA microparticles. DOX is an antitumor drug widely used for HCC treatments. TMMC possessed a mean diameter of 52 µm, an Ms of 72 emu g⁻¹ and they were loaded with 37% (w/w) of nanoparticles and 3% (w/w) of DOX. *In vitro*, after 3 days of elution in phosphate buffered saline solution, 54% of the DOX encapsulated remained in the TMMC. The elution was characterized by a fast release phase during one hour and then a slow kinetics.

The steering was evaluated *in vitro* in a phantom mimicking the hepatic artery under physiological and interventional radiology conditions (injection by catheter, variation of distance between the catheter and the bifurcation from 30 to 20 mm, magnetic gradient from 200 to 400 mT m⁻¹, flow velocity from 7.5 to 12 cm s⁻¹). Steering efficiency was defined as the reduction of the TMMC (or drug) dose in the untargeted area in the presence of magnetic steering *versus* the negative control (no steering). The steering efficiency increased when the magnetic gradient

increased. The efficiency decreased when the flow velocity increased and the catheter was closer to the bifurcation. The efficiency decreased with microparticles with lower steering properties (diameter of 30 μm and M_s of 49 emu g^{-1}). This result confirmed that the TMMC properties were specific to the vascular network being targeted. In the optimal conditions, the steering efficiency reached 70%.

The steering of TMMC was measured *in vivo*. An interventional radiology protocol compatible with MRN was developed to place the catheters, to reduce the hepatic artery blood velocity during the steering and to determine the MRI sequence parameters. TMMC induced signal loss on T2*-weighted magnetic resonance images because of their high M_s which allowed their easy localization in the tissues. The embolization of the hepatic artery branches by TMMC was confirmed by histological analysis. The sustained release of DOX was verified by measuring its plasmatic concentration. TMMC distribution in the tissues was determined by the histological analysis and DOX and cobalt concentration measurements. A significant difference in the TMMC distribution in the liver lobes between the group with MRN and the control group was obtained. The MRN allowed reducing the microparticle concentration in the untargeted area. In the optimal conditions, the steering efficiency reached 50%. The parameters influencing the steering efficiency *in vitro* were confirmed during *in vivo* tests.

The steering of these microparticles could allow the reduction of the secondary effects resulting from chemoembolization in patients with reduced liver functions and a poor survival prognostic. Future work will focus on the MRN conducted in several bifurcations with the evaluation of the therapeutic efficiency of TMMC.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XXIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
1.1 Pathologie du carcinome hépatocellulaire	6
1.1.1 Constitution et fonctions du foie.....	6
1.1.2 Carcinome hépatocellulaire	10
1.1.2.1 Généralités	10
1.1.2.2 Facteurs de développement.....	11
1.1.2.3 Pronostic, classement et stratégie thérapeutique.....	12
1.2 Diagnostic	15
1.2.1 Généralités	15
1.2.2 Échographie	16
1.2.3 Tomographie	17
1.2.4 Imagerie par résonance magnétique.....	18
1.2.5 Tomographie par émission de positrons	19
1.2.6 Histopathologie	20

1.3	Traitements curatifs du carcinome hépatocellulaire	21
1.3.1	Transplantation	21
1.3.2	Résection.....	22
1.3.3	Ablation.....	22
1.3.3.1	<i>Ablation par injection intratumorale</i>	22
1.3.3.2	<i>Ablation par radiofréquence</i>	23
1.3.3.3	<i>Nouvelles techniques d'ablation</i>	24
1.4	Traitements palliatifs du carcinome hépatocellulaire	25
1.4.1	Radiothérapie	25
1.4.2	Embolisation intra-artérielle	26
1.4.3	Radioembolisation	26
1.4.4	Chimiothérapie.....	27
1.4.4.1	<i>Chimiothérapie systémique et artérielle</i>	27
1.4.4.2	<i>Chimiothérapie systémique ciblée</i>	28
1.5	Chimio-embolisation.....	30
1.5.1	Principe	30
1.5.2	Agents anticancéreux	33
1.5.3	Vecteurs embolisants	33
1.5.4	Microparticules à élution d'un agent anticancéreux	35
1.5.5	Limitations	37
1.5.6	Combinaisons avec d'autres traitements.....	37
1.6	Agents magnétiques pour le carcinome hépatocellulaire.....	38
1.6.1	Diagnostic	38
1.6.1.1	<i>Nanoparticules d'oxyde de fer commerciales</i>	38

1.6.1.2	<i>Formulations en développement</i>	40
1.6.2	Traitements	40
1.6.2.1	<i>Ciblage magnétique</i>	40
1.6.2.1.1	<u>Cathéters</u>	40
1.6.2.1.2	<u>Microparticules</u>	41
1.6.2.1.3	<u>Nanoparticules</u>	44
1.6.2.2	<i>Hyperthermie</i>	45
1.6.2.2.1	<u>Microparticules</u>	45
1.6.2.2.2	<u>Nanoparticules</u>	45
CHAPITRE 2	DÉMARCHE SCIENTIFIQUE DES ARTICLES	49
CHAPITRE 3	ARTICLE 1: MAGNETIC NANOPARTICLES ENCAPSULATED INTO BIODEGRADABLE MICROPARTICLES STEERED WITH AN UPGRADED MAGNETIC RESONANCE IMAGING SYSTEM FOR TUMOR CHEMOEMBOLIZATION	51
3.1	Abstract.....	51
3.2	Introduction.....	52
3.3	Materials and methods	55
3.3.1	Materials	55
3.3.2	FeCo nanoparticle synthesis	56
3.3.3	Encapsulation of FeCo nanoparticles into PLGA microparticles	56
3.3.4	FeCo nanoparticle and FeCo-PLGA microparticle characterization	56
3.3.5	MRI magnetic steering.....	57
3.4	Results and discussion	58
3.4.1	<i>FeCo nanoparticles</i>	58
3.4.2	FeCo-PLGA microparticles	59

3.4.3	FeCo-PLGA microparticle MRI magnetic steering.....	60
3.5	Conclusion	61
3.6	Acknowledgements.....	62
3.7	References.....	62
3.8	Supplementary information	67
CHAPITRE 4	ARTICLE 2: COENCAPSULATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND DOXORUBICIN INTO BIODEGRADABLE MICROCARRIERS FOR DEEP TISSUE TARGETING BY VASCULAR MRI NAVIGATION.....	69
4.1	Abstract.....	69
4.2	Introduction.....	70
4.3	Materials & methods.....	72
4.3.1	FeCo nanoparticles.....	72
4.3.2	Encapsulation of FeCo nanoparticles and doxorubicin	72
4.3.3	Characterization experiments.....	73
4.3.4	In vitro steering	73
4.3.5	In vivo steering	74
4.3.6	Histological analysis	74
4.3.7	Determination of cobalt levels in the liver.....	75
4.3.8	Determination of DOX concentrations <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	75
4.3.9	Statistical analysis.....	75
4.4	Results and discussion	76
4.4.1	TMMC properties	76
4.4.2	In vitro steering.....	77
4.4.3	In vivo steering	79

4.5	Conclusion	81
4.6	Acknowledgements.....	82
4.7	References.....	83
4.8	Supplementary information	86
4.8.1	Supplementary methods.....	86
4.8.1.1	<i>FeCo nanoparticle synthesis, annealing and encapsulation preparation.....</i>	86
4.8.1.2	<i>In vitro DOX release</i>	87
4.8.1.3	<i>Theoretical steering method.....</i>	87
4.8.1.4	<i>Synthesis of TMMC with reduced steering properties ($\varnothing = 30 \pm 9 \mu\text{m}$, $M_s = 49 \pm 6 \text{ emu g}^{-1}$)</i>	88
4.8.1.5	<i>In vitro steering</i>	88
4.8.1.6	<i>In vivo protocol: complementary information</i>	89
4.8.1.7	<i>TMMC distribution by histological analysis.....</i>	90
4.8.1.8	<i>Plasmatic DOX concentration analysis</i>	90
4.8.1.9	<i>DOX quantification in the liver.....</i>	91
4.8.2	Supplementary figures	92
4.8.3	Supplementary References.....	97
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	98
5.1	Nanoparticules fer-cobalt.....	98
5.1.1	Fabrication et utilisation des nanoparticules FeCo	98
5.1.2	Biocompatibilité des nanoparticules FeCo	99
5.1.3	Utilisation des nanoparticules de fer.....	99
5.2	TMMC	100
5.2.1	TMMC et les microparticules de PLGA.....	100
5.2.2	TMMC et les microparticules à élution d'un agent anticancéreux	102

5.2.3	TMMC et les microparticules magnétiques pour le CHC	103
5.3	Guidage des TMMC	103
5.3.1	Guidage <i>in vitro</i>	103
5.3.2	Guidage <i>in vivo</i>	105
5.4	Ciblage avec la MRN et ciblage avec des aimants externes	106
5.5	Considérations pour l'utilisation des TMMC à l'échelle humaine	108
CONCLUSION		111
BIBLIOGRAPHIE		114
ANNEXES		139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1: Résumé des fonctions du foie [228].....	9
Tableau 1. 2: Classification de Child [12].....	13
Tableau 1. 3: Classification de Pugh [12]	14
Tableau 1. 4: Caractérisations de l'intensité des nodules de régénération, des nodules de dysplasie, et du CHC en IRM selon les séquences et les agents de contraste (iso-intense, hyperintense, hypo-intense) [247].	19
Tableau 1. 5: Ciblage des nouvelles formulations pour le traitement systémique des CHC [243]	29
Tableau 1. 6: Microparticules utilisées pour l'embolisation du foie [99]	34
Tableau 1. 7: Étude comparative du taux de détection d'un CHC hypervasculaire chez les mêmes patients [221]	39
Tableau 1. 8: Traitement du CHC avec des vecteurs magnétiques dans des modèles animaux (NI = non indiqué)	47
Tableau 1. 9: Détection en IRM des vecteurs magnétiques dans le foie (NI = non indiqué).....	48
Table 4. 1: Characteristics of FeCo nanoparticles and TMMC used for <i>in vivo</i> MRN. Mean \pm SD ($n=6$).	77
Tableau 5. 1: Encapsulation de nanoparticules magnétiques (NI= non indiqué).....	101
Tableau 5. 2: Propriétés des TMMC pour un guidage au niveau de l'artère hépatique propre humaine et dans l'hépatique droite.	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1: (a) Représentation de l'anatomie du système digestif [148], (b) représentation de l'anatomie extra hépatique artérielle, biliaire et portale [11]	7
Figure 1. 2: Anatomie microscopique du foie [12]. (a) Schéma d'une coupe superficielle du foie, représentant la structure hexagonale de ses lobules. (b) Photomicrographie d'un lobule hépatique (x50). (c) Schéma d'un lobule hépatique, qui représente l'apport sanguin et la disposition des hépatocytes en travées. Les flèches indiquent le sens de la circulation sanguine. (d) Schéma agrandi d'une portion d'un lobule hépatique, qui montre les composantes de l'espace interlobulaire (espace porte), la situation des canalicules biliaires, et les cellules de Kupffer dans les sinusoides.....	8
Figure 1. 3: Fréquence du CHC dans le monde standardisée par 100 000 en 2002 [205]	10
Figure 1. 4: Mécanisme possible pour le développement d'un CHC [47]	11
Figure 1. 5: Stratégie proposée pour contenir et traiter le CHC selon les recommandations du BCLC (PS = 'performance status' (état du patient), N1 = 'lymph node involvement' (adénopathie), M1 = 'metastatic spread' (propagation des métastases), CLT = 'cadaveric liver transplantation' (transplantation d'un foie provenant d'un cadavre). LDLT = 'live-donor liver transplantation' (transplantation d'un foie provenant d'un donneur), PEI = 'percutaneous ethanol injection' (injection percutanée d'éthanol), RF = 'radiofrequency' (radiofréquence), TACE = 'transarterial chemoembolization' (chimio-embolisation transartérielle)) [19].	14
Figure 1. 6: Image CT d'un CHC hypo vasculaire dans un foie cirrhotique. Le CHC est une lésion hypodense ronde identifiée par une flèche: (a) au temps artériel et (b) au temps veineux [247].	18

- Figure 1. 7: Images CT d'une ablation par RF d'un CHC: (a) lésion hypo-vasculaire située sous la vésicule biliaire, (b) aiguille RF de 35 mm placée dans la tumeur, (c) zone hypo-dense après le traitement recouvrant entièrement la lésion indiquant une nécrose par coagulation [142]. 23
- Figure 1. 8: Images IRM et angiographiques d'une chimio-embolisation d'un grand CHC : (a) IRM du CHC situé dans le lobe gauche, (b) CHC hyperintense lors d'une séquence IRM de diffusion, (c) IRM du CHC avec une séquence avec un faible coefficient de diffusion, (d) angiographie obtenue par injection sélective d'agent de contraste dans l'artère hépatique montrant une hypertrophie de l'artère hépatique gauche, (e) angiographie montrant des nodules de CHC hypervasculaires envahissant tout le lobe gauche, (f) angiographie de contrôle après la chimio-embolisation avec une injection d'une solution de lipiodol-DOX suivie de microparticules Embospheres 300-500 μ m. L'angiographie montre une embolisation distale presque complète des branches de l'artère hépatique gauche et une déposition diffuse du lipiodol dans les nodules CHC, (g) image CT 1 mois après la CETA montrant l'accumulation de matériau dense dans le CHC, (h) IRM 1 mois après la CETA montrant une perte de contraste (flèches). Néanmoins, aucune réduction de la taille n'est remarquée. (i) et (j) IRM de diffusion montrant une zone tumorale ne répondant pas au traitement (flèches) et une nécrose (tête de flèche). Ceci indique une réponse partielle au traitement [144]..... 31
- Figure 1. 9: Angiographie d'une CETA montrant une tumeur hypervascularisée avec des vaisseaux anormaux(à gauche) et un cathéter (à droite, en blanc) placé de façon très distale de la tumeur [79]. 33
- Figure 1. 10: Imagerie d'un CHC avec (a) un rehaussement au gadolinium lors de la phase artérielle et (b) avec des nanoparticules d'oxyde de fer [247]. 38
- Figure 1. 11: Images du placement progressif d'un cathéter guidé sous IRM depuis l'aorte jusqu'à l'artère hépatique gauche en passant par l'artère hépatique commune. Les quatre bagues magnétiques sur le cathéter créent des artefacts noirs [209]. 41

- Figure 1. 12: Accumulation progressive des microparticules radioactives magnétiques dans une tumeur (grande flèche) du foie suivie en IRM avec une séquence GRE T2*. Les têtes de flèches indiquent les branches distales de l'artère hépatique [70]. 42
- Figure 1. 13: Principe de fonctionnement du traitement du CHC par piégeage avec un champ magnétique externe de microparticules contenant de la DOX [197]. 43
- Figure 3. 1: Schematic representation of the steering of therapeutic magnetic micro carriers (TMMC) for liver chemoembolization: A) Magnetic gradient-controlled steering of TMMC reaching HCC nodules. 1) Release of TMMC from the catheter, 2) Steering of TMMC in the hepatic artery, 3) Steering of TMMC in the left hepatic artery, 4) Steering of TMMC to the tumor blood vessel, 5) Tumor embolization and 6) Drug release. B) Structure of TMMC. 53
- Figure 3. 2: Design of TMMC for the MRI steering in the hepatic artery of the rabbit: A) Schematic view of the TMMC steering in the rabbit hepatic artery. To reach the targeted lobe, TMMC should end up in area B. The transit time of TMMC to cross the hepatic artery radius should be less than the time required by TMMC dragged by the blood flow to reach the bifurcation (t_{max}) B) Comparison of t_{max} to the theoretical transit time of TMMC required to cross the hepatic radius: influence of composition of encapsulated nanoparticles, nanoparticle loading, TMMC diameter and applied magnetic gradient. For a TMMC diameter of 83 μm , the loading of FeCo nanoparticles is 10% and the loading of Fe_3O_4 nanoparticles is 50%. With a loading 30% of FeCo nanoparticles, TMMC diameter decreases from 70 μm to 50 μm when the magnetic gradient increases from 200 mT m^{-1} to 400 mT m^{-1} 54
- Figure 3. 3: A) TEM image of FeCo nanoparticles after annealing (scale bar = 20 nm). B) TEM image of the graphite shell of FeCo nanoparticles (scale bar = 2 nm). C) SEM image of the cross-section of FeCo-PLGA microparticle (scale bar = 10 μm). D) FeCo nanoparticle distribution in the PLGA microparticle (scale bar = 1 μm). In Figs 3c and d, FeCo nanoparticles are white, PLGA are grey and pores are black. 59

- Figure 3. 4: Hysteresis loops recorded at 20°C of —■— FeCo nanoparticles after annealing ($M_s = 209 \pm 1.4 \text{ emu g}^{-1}$), — FeCo nanoparticles before the encapsulation ($M_s = 187 \pm 6.4 \text{ emu g}^{-1}$), and —●— FeCo-PLGA microparticles ($M_s = 61 \pm 2.5 \text{ emu g}^{-1}$). Inset shows the hysteresis loop between 0 to 0.2T..... 60
- Figure 3. 5: FeCo-PLGA microparticles steering efficiency: A) Images of FeCo-PLGA microparticle aggregates in the phantom from steering videos after background subtraction. B) Box plots of the in vitro steering efficiency of FeCo-PLGA microparticles. ◆ quartile Q1, ■ minimum, ▲ median, ○ quartile Q2, × maximum,. *p < 0.05 compared to 0 mT m⁻¹ (Kruskal-Wallis test) (n=5 for -400 mT m⁻¹; n=3 for 0 mT m⁻¹, n=9 for 400 mT m⁻¹). 61
- Figure 3S. 1: Schematic of the MRI steering setup (Alb = albumin)..... 67
- Figure 3S. 2: FeCo-PLGA microparticle size distribution (volume fraction and cumulative volume) determined by optical microscopy image analysis. 67
- Figure 4. 1: Representation of MRI targeting with TMMC for liver chemoembolization. Images A and C are fluoroscopy images of the rabbit hepatic artery with superposed images of the TMMC distribution without (A) and with (C) the MRI targeting. On image A, the microparticles are released from the catheter in the artery and distributed to both lobes. Image B illustrates a schematic representation of a cut of the TMMC loaded with an antitumor drug and magnetic nanoparticles embedded into a biodegradable matrix. Image C displays the MRI targeting of the left bifurcation using the magnetic force (F_{mag}) to preserve the right lobe from the chemoembolization. 71
- Figure 4. 2: A) TEM image of a FeCo nanoparticle coated with a graphite shell. B) SEM image of a TMMC exhibiting apparent porosity. C) Fluorescence microscopy image of a TMMC. The fluorescence signal comes from the encapsulated DOX..... 76
- Figure 4. 3: *In vitro* TMMC steering efficiency as a function of the magnetic gradient (A), TMMC steering properties (B), flow velocity and the distance between catheter tip and right/left hepatic artery bifurcation (C). In (A) and (C), TMMC with $M_s = 72 \pm 3 \text{ emu g}^{-1}$ and $\varnothing = 53 \pm 19 \text{ }\mu\text{m}$ were used. On (B) and (C), a gradient of +/- 400 mT m⁻¹ was applied. On (A) and (B) the flow was set at 12 and at 7.5 cm s⁻¹,

respectively. On (C) a velocity gradient (from 12 to 7.5 cm s⁻¹) was applied to mimic the flow velocity decrease due to the embolization. On (A) and (B) the catheter tip was placed at 33 and 20 mm, respectively. * $p < 0.05$ between the groups, 0 $p < 0.05$ between the groups catheter-bifurcation = 20 mm and catheter-bifurcation = 33 mm. Mean \pm SD ($n=3$)..... 78

Figure 4. 4: *In vivo* TMMC steering data. Images A represent T2*-weighted MR images of the rabbit liver before and after TMMC left steering. The red line delineates the right lobe and the blue line shows the left lobes. S indicates the stomach and L the lungs. Image B displays a microscopic view of the liver parenchyma and the blood vessels stained with hematoxylin and eosin (HA = branch of hepatic artery; HPV = hepatic portal vein; BD = bile duct; NP = FeCo nanoparticles). TMMC are located within a branch of the hepatic artery. Image C shows the variation in TMMC distribution *versus* control in the liver lobes with left and right steering based on Co analysis. Significant difference ($p = 0.029$) between the steering group ($n = 4$) *versus* the control group ($n = 3$) was obtained. Mean \pm SD..... 80

Figure 4S. 1: *In vitro* DOX release from TMMC in PBS buffer at 37°C under sink conditions. At the end of the assay, TMMC contained $54 \pm 1\%$ of the initial encapsulated DOX amount. Mean \pm SD ($n=3$)..... 92

Figure 4S. 2: Theoretical steering of the TMMC as a function of diameter, magnetic gradient applied, flow velocity and distance between the catheter and the bifurcation. Image A displays a schematic view of the TMMC steering in the rabbit hepatic artery. B) Comparison of the time required to cross the hepatic artery radius and the time to reach the bifurcation dragged by the flow according to the distance between the catheter and the bifurcation, the magnetic gradient applied, TMMC characteristics (diameter and M_s) and the flow velocity (12 or 7.5 cm s⁻¹). C) and D) images display the size distribution and the cumulative distribution of TMMC with $M_s = 72 \text{ emu g}^{-1}$ and with $M_s = 49 \text{ emu g}^{-1}$, respectively..... 93

Figure 4S. 3: *In vitro* steering MRI setup. Image A represents a schematic view of the MRI steering setup. Image B is a schematic view of the hepatic artery phantom with its dimensions. On the image, a and b refer to the position of the catheter tip. Image C displays a frame extracted during the recording of a TMMC steering test when the catheter was placed at 20 mm from the bifurcation. 94

Figure 4S. 4: *In vivo* variation in TMMC distribution determined by histology (A) and in DOX concentration (B) *versus* control. The same TMMC distribution profile obtained with the Co analysis was achieved with these two analyses. Good correlation coefficients were found between the TMMC/DOX distribution obtained with the three methods: $r = 0.99$ for AAS and histology results, $r = 0.99$ for AAS and DOX results, and $r = 0.98$ for DOX and histology results. These data confirm that MRN can significantly control the TMMC distribution in the liver. Mean \pm SD (n=4)..... 95

Figure 4S. 5: Plasmatic DOX concentration after TMMC injection. The values were rationalized by the injected dose. The burst effect occurred at 5 min after the injection in both groups. The area under the plasmatic concentration *vs.* time curve (AUC) in the steering group ($AUC = 8505 \pm 4975$) was significantly lower than the one in the control group ($AUC = 23485 \pm 5171$). 96

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – APPROBATION DU PROTOCOLE ANIMAL PAR LES COMITÉS D'ÉTHIQUE.....	139
ANNEXE 2 – CONTRIBUTION DES COAUTEURS	141

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AASLD	‘American association for the study of liver diseases’ (association américaine pour l’étude des maladies du foie)
APF	alpha foetoprotéine
ARF	ablation par radiofréquence
AUC	‘area under the curve’ (aire sous la courbe)
CETA/TACE	chimio-embolisation transartérielle / ‘trans arterial chemoembolization’
CHC	carcinome hépatocellulaire
cm	‘centimeter’ (centimètre)
C _{max}	concentration maximale dans le sang
CT	‘computer tomography’ (tomographie par ordinateur)
DCV	dépôt chimique en phase vapeur
DEB	‘drug eluting bead’ (microparticules à élution d’un agent anticancéreux)
DOX	doxorubicine
EASL	‘European association for the study of the liver’ (association européenne pour l’étude du foie)
emu	‘electro magnetic unit’ (unité électro-magnétique)
G	gauss
g	‘gram’ (gramme)
Gy	gray
Hz	hertz
IPE	injection percutanée d’éthanol
IRM/MRI	imagerie par résonance magnétique / ‘magnetic resonance imaging’

k	kilo
L	‘liter’ (litre)
min	minute
MR	‘magnetic resonance’ (résonance magnétique)
MRN	‘magnetic resonance navigation’ (navigation par résonance magnétique)
Ms	‘saturation magnetization’ (magnétisation à saturation)
Ø	‘diameter’ (diamètre)
Oe	øersted
PGA	‘poly(glycolic acid)’ (poly(acide glycolique))
PLA	‘poly(lactic acid)’ (poly(acide lactique))
PLGA	‘poly(lactic- <i>co</i> -glycolic acid)’ (poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique))
RF	radiofréquence
s	‘second’ (seconde)
SAA	spectrométrie d’absorption atomique
SPIO	‘superparamagnetic iron oxide’ (oxyde de fer superparamagnétique)
SRE	système réticulo-endothélial
T	tesla
TMMC	‘therapeutic magnetic micro carriers’ (micro-transporteurs magnétiques thérapeutiques)
VEGF	‘vascular endothelial growth factor’ (facteur de croissance de l’endothélium vasculaire)
W	watt
w (m)	‘weight’ (masse)

INTRODUCTION

Le ciblage magnétique des tumeurs avec des aimants externes a été proposé au début des années 1980 pour augmenter la concentration d'agents thérapeutiques dans la zone à traiter et limiter sa distribution systémique [207, 239]. Cette approche consiste tout d'abord à attacher [139, 241] ou à encapsuler [32, 33, 38] un agent anticancéreux avec un corps magnétique pour former un vecteur thérapeutique magnétique. Le corps magnétique utilisé est soit un matériau ferromagnétique doux ou superparamagnétique. Sa magnétisation rémanente est très faible voire inexistante quand le matériau n'est pas dans un champ magnétique [137]. La magnétisation, qui correspond à l'alignement des moments magnétiques, croît avec l'augmentation du champ jusqu'à atteindre une valeur limite: la magnétisation à saturation (M_s , emu g^{-1}) [106]. Généralement, les nanoparticules d'oxyde de fer sont utilisées et leur M_s ne dépasse pas 90 emu g^{-1} [31, 50, 85]. La taille du vecteur varie de l'échelle nanométrique à celle micrométrique dépendamment du réseau vasculaire ciblé et des caractéristiques du traitement. La magnétisation du vecteur dépend de son chargement en nanoparticules. Le vecteur est injecté par les voies intraveineuse [129, 138, 169] ou intra-artérielle [32, 225]. Il s'accumule au niveau du site d'intérêt grâce à un champ magnétique généré par un aimant placé le plus près possible de la zone ciblée. L'aimant doit être suffisamment puissant pour créer un champ (T) et un gradient (T m^{-1}) au niveau de la tumeur, susceptibles de capturer le vecteur [182]. Cette capture dépend du gradient appliqué et des propriétés du vecteur (volume et magnétisation dans le champ) [67, 168]. Elle décroît très rapidement avec l'éloignement de l'aimant de la zone ciblée [58]. Généralement, ces vecteurs magnétiques offrent de bons résultats de ciblage dans des tumeurs sous-cutanées ou implantées dans de petits animaux, car l'aimant peut être placé à moins de quelques millimètres de la zone d'intérêt [38, 169]. Cependant, l'application de ce ciblage à l'échelle humaine reste un défi en raison des faibles propriétés magnétiques des vecteurs thérapeutiques, de la vitesse élevée du flot sanguin et de la forte diminution du champ magnétique entre sa source et la zone ciblée [2, 46, 139, 181]. Ainsi, le ciblage dans les tissus profonds reste très difficile à réaliser dans des conditions cliniques.

En 2007, le laboratoire de Nanorobotique de l'École Polytechnique de Montréal a validé une nouvelle approche de ciblage magnétique. Un système d'imagerie par résonance magnétique (IRM) clinique a contrôlé la navigation selon une direction déterminée d'une bille en acier ferromagnétique d'un diamètre de 1,5 mm au niveau d'une artère d'un porc avec un débit sanguin réduit [150]. L'IRM est un système d'imagerie non invasif et non ionisant utilisé couramment pour le diagnostic et le suivi thérapeutique [7, 247]. Ce système est constitué principalement d'un aimant permanent générant un champ de 1,5 à 3 T, de bobines créant les gradients magnétiques d'imagerie dans les 3 dimensions de l'espace et d'un système de radiofréquence (RF) [15]. Pour contrôler la navigation, les gradients de l'IRM étaient utilisés pour exercer une force sur la bille. Cette force magnétique dépendait du gradient appliqué, de la magnétisation de la bille dans l'IRM (généralement M_s [204]) et du volume de la bille [152, 153]. Les gradients de l'IRM, de l'ordre de 40 mT m^{-1} , limitaient la taille de bille à l'échelle millimétrique même avec les meilleurs matériaux magnétiques [183]. Cette première preuve de concept de la navigation par résonance magnétique (MRN) n'avait cependant aucune application clinique en raison de la taille relativement grande de la bille. Afin de contrôler des particules à l'échelle micrométrique, deux bobines générant un gradient jusqu'à 400 mT m^{-1} ont été ajoutées à l'IRM [153]. La distribution de microparticules d'oxyde de fer ($\varnothing = 11 \text{ }\mu\text{m}$, $M_s = 56 \text{ emu g}^{-1}$) a été contrôlée *in vitro* dans un flot avec une vitesse d'écoulement modérée ($12,2 \text{ mm s}^{-1}$) [154]. À partir de ses deux preuves de concept, l'objectif de cette thèse était de mettre au point un premier vecteur thérapeutique compatible avec la MRN. L'application médicale de ce vecteur visait le ciblage des tumeurs du foie en raison de leur vascularisation artérielle.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le cancer le plus fréquent du foie, avec plus de 500 000 cas par an à travers le monde [18, 45, 147, 205, 230]. De nombreuses recherches sont réalisées pour améliorer les traitements du CHC [19]. Cependant, seulement 30 % des patients peuvent bénéficier de traitements curatifs. Les autres patients reçoivent des traitements palliatifs afin de prolonger leur espérance de vie au-delà de 5 mois [19, 20, 22]. La chimio-embolisation est reconnue comme le traitement palliatif standard [115, 125, 132, 134]. Elle combine l'injection par cathéter d'un agent anticancéreux avec l'embolisation des vaisseaux sanguins tumoraux. Cette occlusion bloque l'apport en sang et en nutriments provoquant une ischémie de la tumeur [131]. Ce traitement doit être localisé afin de limiter les multiples effets

secondaires. Cependant, le ciblage de la tumeur est actuellement limité par le positionnement du cathéter. En raison de leurs tailles, les cathéters sont généralement placés à plusieurs bifurcations des vaisseaux sanguins en amont de la zone cancéreuse [79, 98]. Par conséquent, la chimio-embolisation touche les zones saines de l'organe [126]. Récemment, ce traitement a été amélioré par l'utilisation de microparticules embolisantes pouvant libérer progressivement un agent anticancéreux ('drug eluting beads' (DEB)) [189, 229]. Ces microparticules permettent de réaliser le traitement en une seule injection et de diminuer la concentration plasmatique de l'agent cytotoxique. Malgré de multiples recherches, l'efficacité de la chimio-embolisation reste limitée car il est difficile de circonscrire ce traitement au CHC.

Cette thèse visait à développer un vecteur chimio-embolisant compatible avec la MRN au niveau de l'artère hépatique pour cibler le lobe gauche ou droit du foie. L'objectif à long terme est de guider en temps réel ce vecteur pour emboliser seulement les vaisseaux sanguins tumoraux. Ainsi, la chimio-embolisation sera confinée. Cette méthode pourrait contribuer à augmenter l'efficacité thérapeutique de ce traitement et aussi réduire ses effets secondaires. En outre, cette approche diffère du ciblage avec un aimant externe, dont l'efficacité dans les tissus profonds n'a toujours pas été démontrée [2, 181]. En effet, elle propose le contrôle de la distribution du vecteur dès son injection et non son accumulation lors de son éventuel passage au niveau de la tumeur. Ce vecteur est constitué de microparticules magnétiques thérapeutiques appelées des TMMC ('therapeutic magnetic micro carriers'). Les TMMC sont des microparticules embolisantes biodégradables contenant des nanoparticules magnétiques et un agent anticancéreux. Les propriétés magnétiques des TMMC, conférées par les nanoparticules, doivent être suffisantes pour la MRN au niveau de l'artère hépatique. Ce vaisseau sanguin est caractérisé par un débit sanguin très élevé de l'ordre de plusieurs dizaines de centimètres par seconde. De plus, l'agent anticancéreux doit être libéré progressivement dans le temps à partir de microparticules dont le diamètre permet l'embolisation.

Les hypothèses de recherche étaient les suivantes:

Hypothèse 1: il est possible d'encapsuler une quantité suffisante de nanoparticules avec les propriétés magnétiques adéquates dans des microparticules embolisantes pour les guider au niveau de l'artère hépatique.

Hypothèse 2: il est possible de co-encapsuler dans des microparticules biodégradables embolisantes une quantité suffisante de nanoparticules magnétiques pour les guider dans l'artère hépatique en présence d'un agent anticancéreux qui est libéré progressivement dans le temps.

Hypothèse 3: il est possible de cibler le lobe gauche ou droit du foie en guidant les TMMC par la MRN dans l'artère hépatique.

Afin d'étudier ces hypothèses de recherche, les objectifs portaient, dans un premier temps, sur la mise au point et la fabrication des TMMC, puis dans un deuxième temps sur la navigation des TMMC *in vitro* et *in vivo*. Le premier objectif consistait à concevoir et à fabriquer des microparticules biodégradables magnétiques compatibles avec la MRN pour confirmer la faisabilité du projet. Avant la réalisation d'un premier vecteur, une étude de conception des TMMC a été réalisée en considérant les contraintes de la chimio-embolisation et de la MRN. En prévision des essais *in vivo*, les paramètres physiologiques du lapin ont été pris en considération. Ce modèle animal a été choisi, car il est couramment utilisé pour tester de nouveaux traitements par chimio-embolisation [80]. Cette étude a permis de déterminer le diamètre des microparticules, le type et le taux de chargement de nanoparticules et les procédés de fabrication. Ensuite, les nanoparticules magnétiques choisies ont été synthétisées et caractérisées (diamètre, propriétés magnétiques, composition) jusqu'à l'obtention des propriétés nécessaires pour l'encapsulation. Par la suite, ces nanoparticules ont été encapsulées dans des microparticules biodégradables embolisantes. Dès que les propriétés des microparticules ont satisfait les contraintes de la MRN, un modèle *in vitro* de l'artère hépatique a été développé. Des essais de guidage *in vitro* dans des conditions physiologiques ont permis de valider la conception des TMMC.

Le deuxième objectif portait sur la fabrication des TMMC. Un agent anticancéreux et des nanoparticules ont été co-encapsulées dans des microparticules biodégradables embolisantes. Les propriétés des TMMC étudiées étaient: le chargement en nanoparticules et en agent anticancéreux, les propriétés magnétiques, la libération *in vitro* de l'agent anticancéreux dans le temps, les propriétés de surface et la distribution de taille.

Le troisième objectif portait sur la MRN des TMMC *in vitro* et *in vivo*. Des essais de guidage *in vitro* des TMMC dans des conditions physiologiques et de radiologie interventionnelle ont été effectués pour déterminer les paramètres affectant l'efficacité de guidage. Ensuite, le protocole de radiologie interventionnelle compatible avec la MRN a été mis au point. Finalement, le ciblage du lobe droit ou gauche du foie par la MRN au niveau de l'artère hépatique a été testé sur plusieurs lapins (4) et comparé à des contrôles (3). Des méthodes spécifiques aux TMMC ont été mises au point pour déterminer leur distribution dans le foie.

Cette thèse commence par une revue de littérature sur le carcinome hépatocellulaire pour identifier les contraintes physiologiques et thérapeutiques pour le développement des TMMC. Le chapitre 2 présente la démarche scientifique présentée dans les deux articles publiés dans le journal 'Biomaterials'. Ces articles présentent et discutent les résultats obtenus dans cette thèse dans les chapitres 3 et 4. Le chapitre 5 est une discussion générale sur ce projet de recherche. Cette thèse se termine par la conclusion et les recommandations.

CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

Cette revue de littérature traite du carcinome hépatocellulaire (CHC). Ce chapitre commence par une présentation du foie et de la pathologie du CHC. Ensuite, les différentes techniques de diagnostic sont présentées suivies par les traitements curatifs et palliatifs. La chimio-embolisation est ensuite décrite afin de mettre en évidence les contraintes thérapeutiques pour la conception des TMMC. Cette revue se termine par la présentation des vecteurs magnétiques pour le diagnostic et le traitement du CHC.

1.1 Pathologie du carcinome hépatocellulaire

Cette section commence par la constitution du foie et de ses fonctions, puis le développement d'un CHC et se termine avec le pronostic vital, les classements des CHC et les choix thérapeutiques.

1.1.1 Constitution et fonctions du foie

Le foie est situé sous le diaphragme vers le côté droit et il est entièrement contenu dans la cage thoracique [148] (Figure 1. 1). Il pèse entre 1400 et 1600 g et il est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Il se divise en 4 lobes: le lobe droit qui est le plus grand, le lobe gauche, le lobe caudé et le lobe carré. Ses deux derniers sont visibles lorsque le foie est observé par-dessous [12, 148]. L'alimentation sanguine se fait par la veine porte (75 %) et par l'artère hépatique (25 %) (Figure 1. 1). La veine porte, formée de l'union de la veine splénique et de la veine mésentérique supérieure, apporte au foie le sang de la rate et du tube digestif. L'artère hépatique, branche du tronc cœliaque, apporte le sang artériel qui assure 50 % de l'oxygénation de l'organe. L'artère hépatique se divise dans le foie en deux branches (gauche et droite) et chaque branche donne naissance à des ramifications cheminant dans le parenchyme.

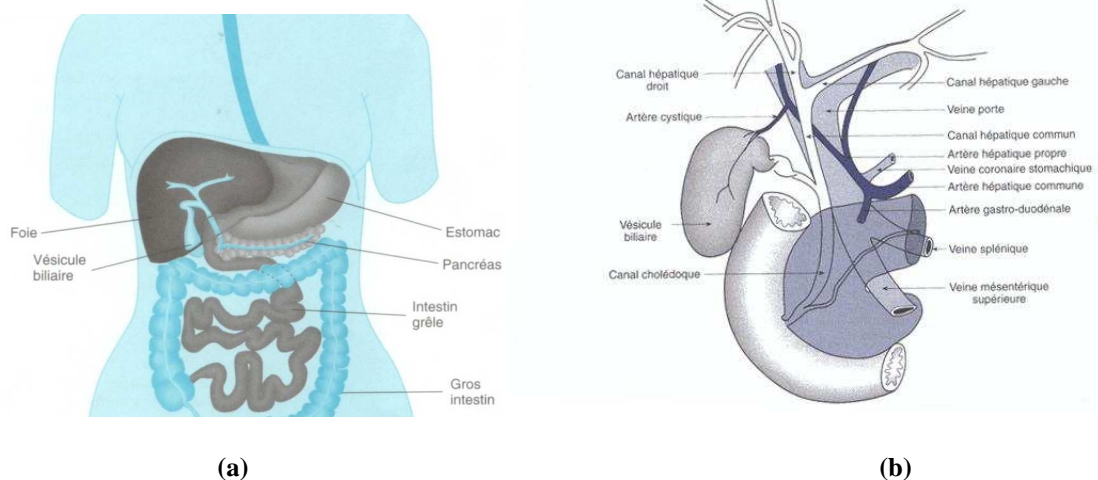


Figure 1. 1: (a) Représentation de l'anatomie du système digestif [148], (b) représentation de l'anatomie extra hépatique artérielle, biliaire et portale [11]

L'unité de structure du foie est le lobule hépatique ayant une forme polyédrique, dont chaque angle est occupé par un espace porte (Figure 1. 2). Chaque espace porte contient une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et 1 ou 2 canaux biliaires. Les cellules hépatiques, appelées hépatocytes, sont disposées en rangées d'une cellule d'épaisseur. Ces rangées délimitent des sinusoides à l'intérieur desquelles se fait la circulation sanguine [12]. Les sinusoides sont bordées par des cellules endothéliales. Les cellules de Kupffer sont des macrophages du système réticulo-endothélial (SRE) qui sont accrochées à la face luminale des cellules endothéliales. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères. Les hépatocytes sont des cellules polyédriques dont le diamètre varie de 20 à 30 μm . Un foie normal contient environ 100 milliards d'hépatocytes, ce qui représente 80 % du volume du foie.

Les fonctions du foie sont multiples: rôles métaboliques et régulateurs, et producteur de bile qui est utilisée dans le duodénum pour la digestion (Tableau 1. 1) [148, 228]. En raison de toutes ses fonctions, le foie est un organe vital. Ainsi, quand un CHC se développe, le pronostic vital devient rapidement sombre, car les fonctions du foie ne sont plus maintenues.

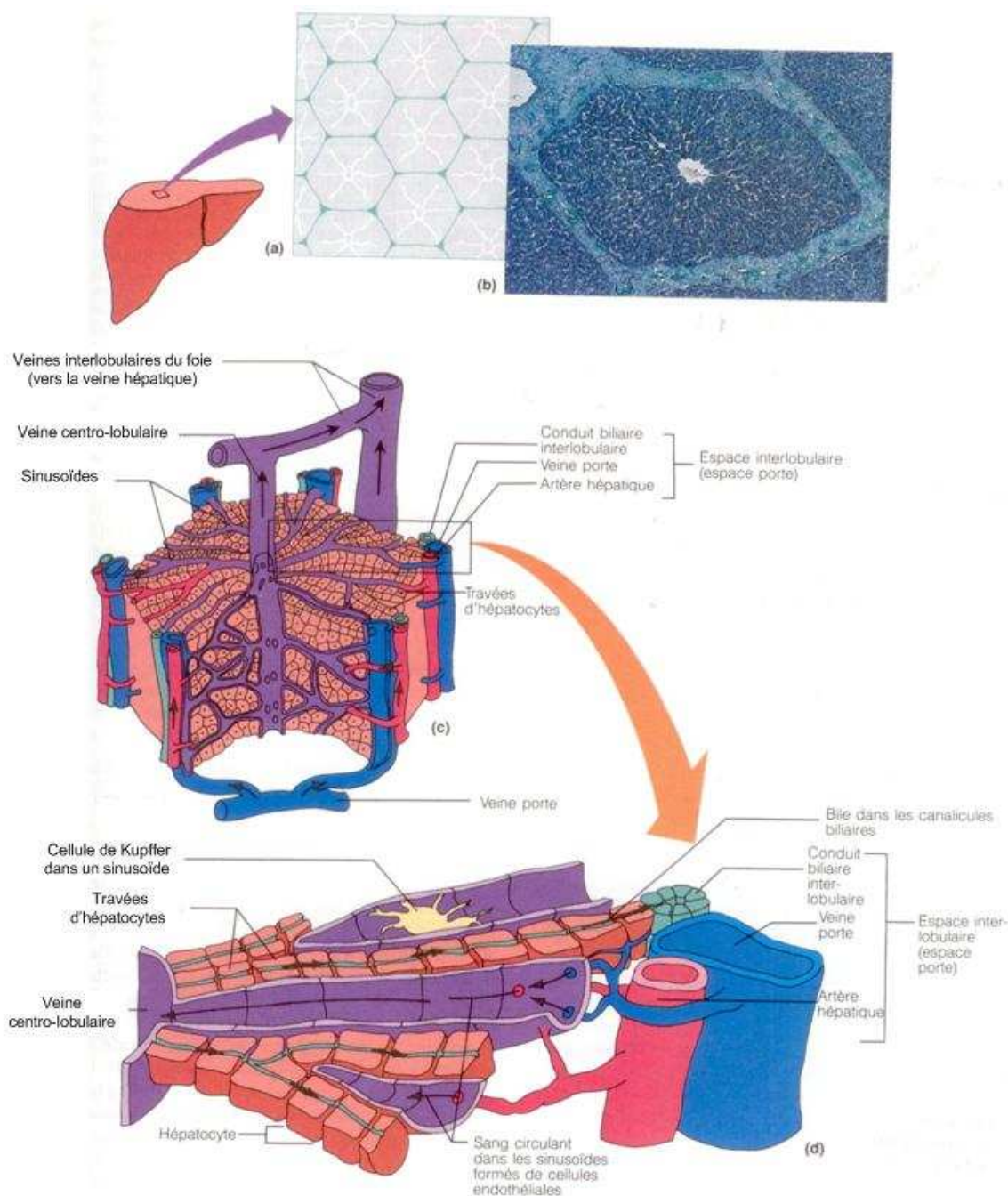


Figure 1. 2: Anatomie microscopique du foie [12]. (a) Schéma d'une coupe superficielle du foie, représentant la structure hexagonale de ses lobules. (b) Photomicrographie d'un lobule hépatique (x50). (c) Schéma d'un lobule hépatique, qui représente l'apport sanguin et la disposition des hépatocytes en travées. Les flèches indiquent le sens de la circulation sanguine. (d) Schéma agrandi d'une portion d'un lobule hépatique, qui montre les composants de l'espace interlobulaire (espace porte), la situation des canalicules biliaires, et les cellules de Kupffer dans les sinusoides.

Tableau 1. 1: Résumé des fonctions du foie [228]

Fonctions endocrines

1. En réponse à l'hormone de croissance, il sécrète l'IGF-1, qui favorise la croissance en stimulant la mitose dans divers tissus.
2. Il participe à l'activation de la vitamine D.
3. Il forme la triiodothyronine (T3) à partir de la thyroxine (T4).
4. Il sécrète l'angiotensinogène que la rénine transforme en angiotensine I.
5. Il métabolise les hormones.

Fonctions dans la coagulation

1. Il produit un grand nombre de facteurs plasmatiques de coagulation (prothrombine et fibrinogène).
2. Il produit les sels biliaires qui sont essentiels à l'absorption gastro-intestinale de la vitamine K, qui est elle-même essentielle à la production des facteurs de coagulation.

Protéines plasmatiques

Il synthétise et sécrète l'albumine plasmatique, les protéines de la phase aiguë, les protéines de liaison des hormones stéroïdes et des oligo-éléments, les lipoprotéines et les autres protéines mentionnées dans ce tableau.

Fonctions digestives

1. Il synthétise et sécrète les sels biliaires qui sont nécessaires à la digestion et à l'absorption des lipides.
2. Il sécrète dans la bile une solution d'ions inorganiques riches en bicarbonate, qui aide à neutraliser l'acide chlorhydrique dans le duodénum.

Métabolisme organique

1. Il convertit le glucose plasmatique en glycogène et en triacylglycérols au cours de la période d'assimilation.
2. Il convertit les acides aminés en acides gras qui sont incorporés dans les triacylglycérols au cours de la période d'assimilation.
3. Il synthétise les triacylglycérols et les sécrète sous forme de lipoprotéines au cours de la période d'assimilation.
4. Il produit le glucose à partir du glycogène (glycogénolyse) et d'autres sources (néoglucogenèse) au cours de la période de jeûne et libère le glucose dans le sang.
5. Il convertit les acides gras en corps cétoniques au cours du jeûne.
6. Il produit l'urée, le principal produit terminal du catabolisme des acides aminés (et des protéines), et la libère dans le sang.

Métabolisme du cholestérol

1. Il synthétise le cholestérol et le libère dans le sang.
2. Il sécrète le cholestérol plasmatique dans la bile.
3. Il convertit le cholestérol plasmatique en acides biliaires.

Fonctions d'excrétion et de dégradation

1. Il sécrète la bilirubine et d'autres pigments biliaires dans la bile.
2. Il excrète dans la bile un grand nombre de molécules organiques endogènes et étrangères ainsi que des oligoéléments.
3. Il effectue la biotransformation d'un grand nombre de molécules organiques endogènes et étrangères.
4. Il détruit les vieux érythrocytes.

1.1.2 Carcinome hépatocellulaire

1.1.2.1 Généralités

Le carcinome hépatocellulaire est le cancer primaire du foie le plus fréquent (90 % des cas) [205]. Sa fréquence augmente à travers le monde avec le taux de cas le plus élevé dans les régions d'Asie, et une augmentation en Europe, Australie, Japon, et en Amérique du Nord (Figure 1. 3) [18, 45, 230]. En 2003, on a comptabilisé plus de 1 million de morts par an. La fréquence ainsi que le taux de mortalité sont plus élevés chez l'homme que chez la femme (Figure 1. 3) [205].

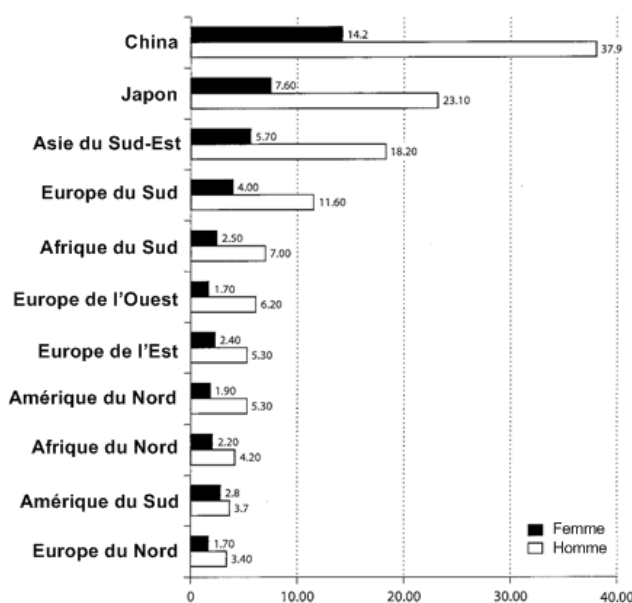


Figure 1. 3: Fréquence du CHC dans le monde standardisée par 100 000 en 2002 [205]

L'hépatocarcinogenèse est considérée comme un procédé complexe ayant plusieurs étapes. Elle commence par des dommages aux hépatocytes (Figure 1. 4). La dégradation des hépatocytes entraîne le développement d'une quantité exagérée de tissus fibreux. Pour compenser la destruction de ces cellules, un mécanisme de régénération s'active. Cependant, en raison de la fibrose, cette régénération n'aboutit plus à la reconstruction des lobules normaux. Elle conduit à la formation d'amas d'hépatocytes ayant perdu leurs connexions vasculaires et biliaires normales,

auxquels on donne le nom de nodules de régénération [12]. Ensuite, un cycle non restreint de prolifération/régénération se produira jusqu'à l'apparition d'une inflammation suivie d'une mutation caractérisée par la production de facteurs angiogéniques [243].

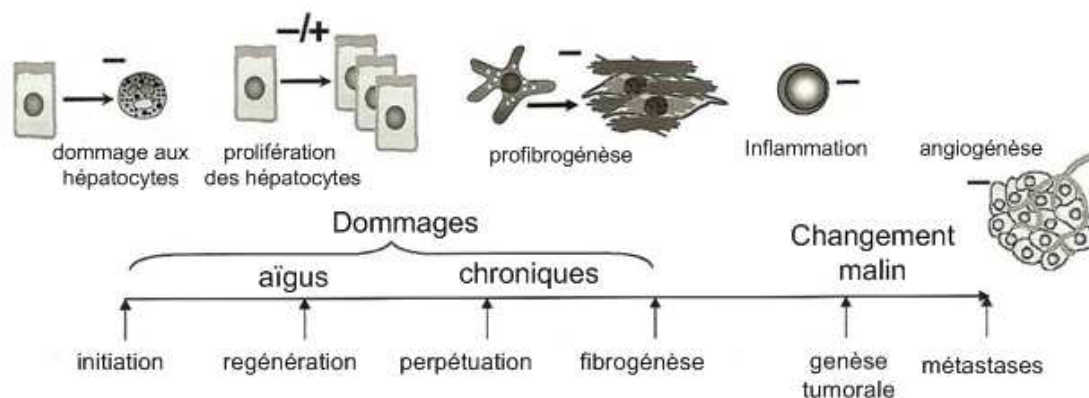


Figure 1. 4: Mécanisme possible pour le développement d'un CHC [47]

Un CHC provoque une détérioration du foie, car les cellules de l'organe sont progressivement remplacées par celles cancéreuses. Le CHC est caractérisé par une hypervascularisation artérielle. En effet, les nodules tumoraux s'alimentent en dérivant le flux sanguin de l'artère hépatique, tandis que les tissus normaux du foie sont alimentés par la veine porte. La croissance tumorale est liée au flux artériel. L'invasion de la veine porte par le CHC peut contribuer à empirer le dysfonctionnement hépatique en diminuant le flux sanguin dans le foie (Figure 1. 1) [45].

1.1.2.2 Facteurs de développement

Dans 80 % des cas, le CHC résulte d'une complication d'une cirrhose [12]. Une infection avec le virus de l'hépatite B ou C conduit à une inflammation chronique entraînant une fibrose, qui selon l'individu, l'environnement et les facteurs viraux peut progresser en une cirrhose [205]. À travers le monde, la cirrhose due à l'hépatite B est la cause principale de mort reliée au CHC. Environ 60 % des CHC en Afrique et en Asie ont été attribués à une infection par l'hépatite B tandis qu'au Japon, en Europe et aux Etats-Unis, 1 cas sur 5 était dû à cette infection. Pour le virus de l'hépatite B, 8 génotypes ont été identifiés. Selon le génotype, le risque de CHC est plus

important [205]. Le développement d'un CHC d'origine virale est influencé par plusieurs cofacteurs comme l'âge de l'infection, une infection concomitante avec un autre virus de l'hépatite ou le virus du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), et une augmentation de la consommation d'alcool ou de cigarettes. Le risque de développement d'un CHC est 17 fois plus grand chez un patient présentant une hépatite C.

Dans les pays industrialisés, une consommation élevée d'alcool (50-70 g / jour) représente un des principaux facteurs de risques pour le développement d'une cirrhose pouvant entraîner un CHC [205]. La consommation d'alcool augmente par 2 le risque de développer un CHC et par 5 à 7 fois dans le cas d'une consommation supérieure à 80 g par jour pendant plus de 10 ans. La consommation chronique d'alcool conduit à une augmentation du stockage des matières grasses dans les hépatocytes. Elle entraîne une stéatose alcoolique dans 30 % des cas et dans 10 à 20 % des cas une cirrhose propice au développement d'un CHC. La stéatose non alcoolique, provoquée par une accumulation de graisse, constitue aussi un facteur de risque pour le CHC. L'obésité (indice de masse corporelle $> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$) augmente le risque de développer un CHC. Les personnes diabétiques présentent un risque 3 fois supérieur de développer un CHC. Une combinaison d'une accumulation de graisses dans les hépatocytes, d'une obésité et de diabète est associée avec un plus haut taux de progression de la fibrose [205]. Une accumulation excessive de fer dans le foie, peut provoquer une hépatite chronique entraînant une fibrose [205]. Un autre facteur de risque, principalement dans les régions tropicales (Asie et Afrique), est la prise d'aflatoxine B₁ par la consommation de grains contaminés par l'*Aspergillus fumigatus*.

1.1.2.3 Pronostic, classement et stratégie thérapeutique

Le manque de biomarqueurs pour une détection précoce, les fonctions du foie compromises par une hépatite virale ainsi que la résistance du CHC aux traitements existants font que ce cancer est l'un des plus difficiles à guérir [158]. Le CHC constitue un problème de santé majeur à travers le monde. Le pronostic sans traitement spécifique est médiocre: la médiane de survie des patients avec une tumeur précoce est de 6 à 9 mois et de 1 à 2 mois avec une tumeur avancée. De plus, le CHC étant une tumeur hétérogène avec différents comportements biologiques, il est très difficile de fournir des recommandations cliniques précises. Par exemple,

une petite tumeur détectée à un stade précoce peut avoir la même agressivité qu'une large tumeur métastatique. En outre, la vitesse de croissance du CHC est très variable. Généralement, quand la tumeur est de petite taille, la croissance est initialement lente avec un temps de doublement d'un an ou plus, puis la croissance devient rapide. Au cours de l'évolution du CHC, diverses complications peuvent apparaître: un ictère causé par l'obstruction des voies biliaires intra- ou extrahépatiques, une ascite en rapport avec l'obstruction de la veine porte et des métastases au niveau des poumons et des os [12].

Différents systèmes de classement du CHC ont été proposés [158]. Les paramètres utilisés dans les différents classements peuvent être regroupés en quatre catégories: (i) les facteurs tumoraux comme la taille de la tumeur, la thrombose de la veine porte et la concentration d'alpha foetoprotéine (APF) sérique, (ii) les fonctions du foie comme la note selon la classification Child-Pugh (Tableau 1. 2, Tableau 1. 3), (iii) l'état général du patient et (iv) l'efficacité du traitement [158]. Bien que l'association américaine pour l'étude des maladies du foie ('American association for the study of liver diseases' (AASLD)) suggère de suivre le système de classement 'Barcelona Clinic Liver Cancer' (BCLC), il n'existe pas de consensus sur le classement des CHC, car la prédiction du pronostic des patients reste très complexe. Dans le classement BCLC, le stade du CHC est caractérisé par trois catégories Child-Pugh A, B et C (Tableau 1. 2). Chaque Child-Pugh correspond à une note calculée selon les propriétés du foie et du patient (Tableau 1. 3) [18]. Le classement BCLC sera utilisé dans cette revue.

Tableau 1. 2: Classification de Child [12]

	Classe A	Classe B	Classe C
Bilirubine	< 35 $\mu\text{mol/L}$	35-50 $\mu\text{mol/L}$	> 50 $\mu\text{mol/L}$
Albumine	> 35 g/L	30-35 g/L	< 30 g/L
Ascite	absente	facilement contrôlée	difficilement contrôlable
Encéphalopathie	absente	minime	coma
État nutritionnel	excellent	bon	mauvais

Tableau 1. 3: Classification de Pugh [12]

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie	absente	confusion	coma
Ascite	absente	discrète	modérée
Bilirubine	< 35 µmol/L	35-50 µmol/L	> 50 µmol/L
Albumine	> 35 g/L	28-35 g/L	< 28 g/L
Prothrombine	> 50 %	40-50 %	< 40 %

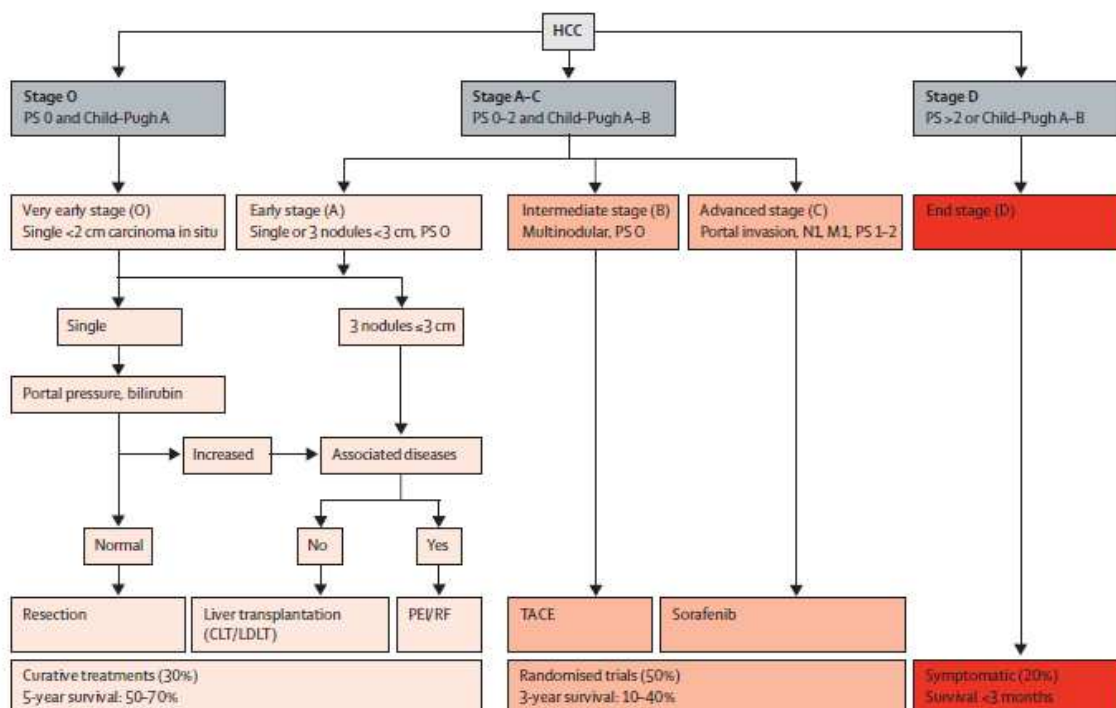


Figure 1. 5: Stratégie proposée pour contenir et traiter le CHC selon les recommandations du BCLC (PS = ‘performance status’ (état du patient), N1 = ‘lymph node involvement’ (adénopathie), M1 = ‘metastatic spread’ (propagation des métastases), CLT = ‘cadaveric liver transplantation’ (transplantation d’un foie provenant d’un cadavre). LDLT = ‘live-donor liver transplantation’ (transplantation d’un foie provenant d’un donneur), PEI = ‘percutaneous ethanol injection’ (injection percutanée d’éthanol), RF = ‘radiofrequency’ (radiofréquence), TACE = ‘transarterial chemoembolization’ (chimio-embolisation transartérielle)) [19].

À partir du classement BCLC, des stratégies de traitement ont été proposées (Figure 1. 5). La surveillance des patients à risques (cirrhose, hépatites) permet d'améliorer le taux de survie des patients [21]. Ainsi, le diagnostic d'un CHC à son premier stade augmente la possibilité de traiter de façon radicale la tumeur et réduit le recours à un traitement palliatif [158, 230]. Néanmoins, ce type de diagnostic est seulement posé dans 30 % des cas. La résection et la transplantation ne peuvent être réalisées que chez des patients avec des petites tumeurs non métastatiques. La présence d'une cirrhose est un des facteurs qui influence le plus les choix de traitements ainsi que la survie du patient [205]. Les traitements du CHC sont répartis en deux catégories: les traitements curatifs (résection, ablation et transplantation) et les traitements palliatifs (chimiothérapie, embolisation, chimio-embolisation, radiothérapie, radioembolisation) (Figure 1. 5).

1.2 Diagnostic

Cette section présente les techniques utilisées pour le diagnostic et le suivi d'un traitement. Certaines de ces modalités sont aussi utilisées lors de la réalisation d'un traitement.

1.2.1 Généralités

En raison du développement rapide de la maladie, du pronostic médiocre et des limitations des traitements curatifs, le dépistage et la surveillance des CHC sont très importants [203]. Cliniquement, le CHC reste généralement silencieux aux premiers stades. Les symptômes comme la douleur abdominale, la perte de poids, une masse palpable ainsi que les signes d'une cirrhose décompensée (avec complications) deviennent plus évidents avec la progression de la tumeur. Quand une tumeur avancée est détectée, le patient n'a presque plus d'option thérapeutique. Ainsi, un dépistage des patients ayant une maladie du foie par une ou plusieurs techniques d'imagerie en combinaison avec une mesure de l'AFP sérique est recommandé tous les 6 mois [12, 94].

L'hyper vascularisation artérielle est considérée comme un marqueur du CHC (phase artérielle, phase veineuse et phase tardive). Elle est utilisée à des fins de diagnostic avec les techniques d'imagerie [203]. Le temps du lavage de l'agent de contraste dans un CHC semble corrélér avec le degré de différenciation de la tumeur. En effet, tandis que des tumeurs moyennement voire faiblement différenciées présentent un lavement rapide de l'agent de contraste, les tumeurs bien différenciées ont un lavement lent. En outre, l'examen du foie peut montrer soit une tumeur unique, soit plusieurs tumeurs. La présence de plusieurs tumeurs a une origine multifocale ou provient d'une dissémination dans le foie d'une tumeur mère. Au cours d'un examen, en plus d'évaluer le nombre et la taille des nodules cancéreux, il faut regarder les facteurs de risques (foie cirrhotique et état de la veine porte) [12, 247]. Dans un foie cirrhotique, la présence de nodules de régénération de 10 à 30 mm complique l'examen [7]. Aussi, la moitié des nodules CHC de moins de 10 mm ne correspondent pas à des CHC, et même si c'est le cas, il est difficile d'identifier correctement leur nature avec les outils de diagnostic actuels. Ainsi, le défi pour le gastroentérologue, le chirurgien et le radiologiste est de détecter, d'identifier et de caractériser toutes les lésions afin d'administrer au patient le traitement approprié [247].

La meilleure modalité pour la détection des lésions CHC ne fait pas l'objet d'un consensus, car il est difficile avec une seule technique de réaliser un examen complet [203]. Généralement, le diagnostic commence par une série d'images acquises par échographie, suivi selon le cas d'un examen en tomographie par ordinateur ('computed tomography' (CT)) ou en IRM. En cas de doute, un examen histopathologique est effectué.

1.2.2 Échographie

Selon l'association européenne pour l'étude du foie ('European association for the study of the liver' (EASL)) et l'association AASLD, l'échographie est recommandée comme outil pour la surveillance des patients à risque. Les ultrasons (US) permettent un test radiologique non-invasif et non-ionisant, rapide et à moindre coût [21]. En échographie, un CHC apparaît généralement comme une lésion vascularisée. Ainsi, la détection des nodules CHC dépend fortement de leur taille [203]. Les CHC dépassant 30 mm peuvent être diagnostiqués avec précision par les US conventionnels. Cependant, les signaux peuvent être faibles dans les plus

petits nodules. Par ailleurs, le diagnostic des petites lésions dans le foie cirrhotique est compliqué en raison des inhomogénéités du parenchyme. Les sensibilités reportées par les systèmes d'US conventionnels pour la détection des nodules CHC varient entre 35 et 84 % selon l'expertise de l'opérateur et l'équipement.

La détection des petites lésions peut être améliorée par l'injection d'agents de contraste. Ces agents sont des microbulles stabilisées contenant soit de l'air (première génération) ou d'autres gaz (seconde génération d'agents de contraste) comme SonoVue[®] (Braco, Italie) contenant du sulfure hexafluoride gazeux [203]. Ils permettent une meilleure visualisation de la vascularisation de la tumeur. La sensibilité atteint 89-96 % selon de la taille du nodule [203]. Cependant, l'agent de contraste n'améliore pas la sensibilité pour la détection des petits nodules de moins de 10 mm. Par ailleurs, la détection d'un CHC par l'échographie est limitée si les lésions sont éloignées de la sonde. En effet, l'examen complet du parenchyme peut être limitée par la corpulence du patient, une interposition du colon, la dose injectable d'agents de contraste et par les changements morphologiques induits par la cirrhose.

1.2.3 Tomographie

Le critère principal pour le diagnostic par CT est la description des changements de la vascularisation des nodules. Un examen triphasique du foie contenant des acquisitions au temps artériel, au temps veineux et au temps tardif est une pratique standard (Figure 1. 6). La pathologie de la tumeur est décrite par lavement de l'agent de contraste. Dans le cas d'une injection intraveineuse de l'agent de contraste, le CHC se présente typiquement comme une lésion hyperdense pendant la phase artérielle avec ensuite un lavage vers une lésion iso ou hypodense pendant la phase veineuse (Figure 1. 6) [247]. Néanmoins, comme le CT ne peut mettre en avant que la vascularisation des lésions, il est difficile de distinguer dans un foie cirrhotique les différents types de nodules [247]. Les taux de détection des CHC publiés sont très variables. La sensibilité de cette technique est d'environ 60 %. Les lésions dépassant 20 mm sont détectées avec un taux de 100 %, tandis que pour les lésions de moins de 10 mm le taux est de seulement 10 %.

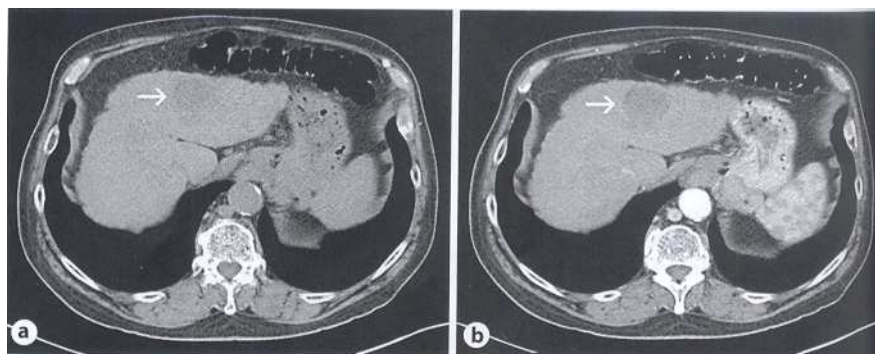


Figure 1. 6: Image CT d'un CHC hypo vasculaire dans un foie cirrhotique. Le CHC est une lésion hypodense ronde identifiée par une flèche: (a) au temps artériel et (b) au temps veineux [247].

1.2.4 Imagerie par résonance magnétique

Grâce aux agents de contraste et aux différentes séquences d'imagerie, l'examen par IRM permet de caractériser plusieurs paramètres même dans un foie cirrhotique: (i) la vascularisation, (ii) la densité cellulaire, (iii) la composition des tissus grâce aux séquences de précontrastes et de diffusion avec différents temps de relaxation (T_1 , T_2 et T_2^*), (iv) la détection des cellules de Kupffer par les particules superparamagnétiques d'oxyde de fer ('superparamagnetic particles of iron oxide' (SPIO)) et (v) l'intégrité des fonctions hépatocellulaires et l'excrétion biliaire par des agents de contraste hépatobiliaires (Tableau 1. 4) [7, 221, 247].

Les agents de contraste utilisés pour l'IRM du foie sont, d'un côté, des agents de gadolinium non-spécifiques et extracellulaires, et de l'autre côté, des agents spécifiques aux éléments présents dans l'organe. La deuxième catégorie est divisée entre les particules d'oxyde de fer et les agents hépatobiliaires. Il existe actuellement sur le marché cinq agents de contraste spécifiques pour le foie. Les séquences 'gradient recalled echo' (GRE) ou 'fast spin echo' (FSE) sont établis depuis plusieurs années comme un standard pour l'IRM abdominal. Les techniques d'IRM de diffusion ('diffusion-weighted MRI' (DWI)) sont de plus en plus utilisées. Une étude IRM du foie en comprend généralement une séquence FSE et/ou une séquence FSE T_2 avec saturation de la graisse, une séquence de diffusion, et une séquence dynamique 3D GRE T_1 avec saturation de la graisse après l'injection d'un agent de contraste (Tableau 1. 4) [247]. Selon le

type d'agent de contraste spécifique injecté, des séquences additionnelles sont réalisées: GRE T2* pour les SPIO et T1 2D ou 3D pour les agents hépatobiliaires.

Tableau 1. 4: Caractérisations de l'intensité des nodules de régénération, des nodules de dysplasie, et du CHC en IRM selon les séquences et les agents de contraste (iso-intense, hyperintense, hypo-intense) [247].

	Nodules de régénération	Nodules de dysplasie	CHC
IRM ordinaire			
2D GRE T1	iso	hyper	hyper ou hypo
FSE T2	iso ou hypo	iso ou hypo	hyper
IRM en phase dynamique			
Temps artériel	pas de rehaussement	pas de rehaussement	rehaussement artériel
Temps veineux/ temps tardif	pas de lavage	pas de lavage	lavage veineux
Agent spécifique au foie			
SPIO	iso ou hypo	iso	Hyper
Agents hépatobiliaires	iso	hyper ou hypo	Hypo

Comme pour le CT, on retrouve une hyper vascularisation pendant la phase artérielle et un lavage au temps veineux. L'IRM permet d'obtenir de très bons taux de détection même avec des petites lésions de moins de 20 mm. Si on compare l'IRM et le CT, pour les CHC de plus de 20 mm, le taux de détection est de 100 % pour les deux techniques. Pour les CHC entre 10 et 20 mm, l'IRM a un taux de détection de 89 % et le CT de 65 %. Pour les CHC inférieures à 10 mm le taux de détection de l'IRM est de 34 % et celui du CT de 10 % [247].

1.2.5 Tomographie par émission de positrons

La tomographie par émission de positrons (TEP) mesure les propriétés biochimiques et physiologiques des tissus normaux ou anormaux grâce à des agents biochimiques radioactifs.

Généralement, l'agent le plus utilisé est le ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG). La ^{18}F FDG-TEP permet d'évaluer le transport de glucose dans les cellules. Ainsi, elle sert à la détection des tumeurs malignes et à évaluer la réponse au traitement [75]. Selon le niveau de différenciation du CHC, les transporteurs de glucose sont plus ou moins exprimés. Par conséquent, la TEP est plus efficace pour la différenciation des tumeurs que pour la détection des CHC [100]. Un autre marqueur, le ^{11}C -acetate, permet d'évaluer la synthèse des acides gras dans la tumeur du foie [86]. Il est de plus en plus utilisé pour le suivi d'un CHC. La TEP permet aussi d'évaluer la présence de métastases hépatiques. Cette détection est importante lors de la sélection des patients pour les traitements curatifs. C'est pourquoi l'utilisation de la TEP est en plein essor pour le diagnostic et le suivi des CHC et des métastases du foie.

1.2.6 Histopathologie

Dans le cas des tumeurs d'au moins 10 mm sans une vascularisation atypique et un niveau d'AFP sérique supérieur à 200 ng/mL, le traitement d'un CHC est suggéré sans biopsie [94]. La biopsie est utilisée pour le diagnostic des petits CHC et pour évaluer la différenciation. Elle ne doit être envisagée que si les méthodes non invasives donnent des résultats équivoques à cause de ses effets secondaires possibles comme un saignement, surtout pour les patients cirrhotiques, et un risque de dépôt de cellules cancéreuses le long de l'aiguille de biopsie.

L'apparence macroscopique d'un CHC peut être variable avec des nodules tumoraux simples ou multicentriques, des nodules bien démarqués du foie environnant, des nodules encapsulés et des nodules avec une croissance infiltrant le tissu. Les nodules tumoraux peuvent fréquemment présenter des zones d'hémorragie et de nécrose. À l'échelle microscopique, généralement, un CHC ressemble à un tissu normal selon le degré de différenciation [94]. Les cellules tumorales d'un CHC peuvent être distinguées des hépatocytes normaux en particulier par un plus grand ratio noyau/cytoplasme, un noyau proéminent, et/ou des invaginations cytoplasmiques dans le noyau. Pour autant, l'évaluation par histopathologie peut être difficile en raison d'un tissu tumoral étendu ainsi que par la présence de plusieurs types de lésions. L'immunohistochimie peut être utilisée pour évaluer la différenciation d'un CHC. Cependant,

elle ne peut pas fonctionner avec des tumeurs peu ou pas différenciées. Ainsi, le diagnostic définitif peut rester incertain malgré un examen histologique.

1.3 Traitements curatifs du carcinome hépatocellulaire

Cette section présente les traitements curatifs proposés selon le BCLC (Figure 1. 5). Ils comprennent la transplantation, la résection et l'ablation thermique ou par injection intratumorale.

1.3.1 Transplantation

Cette technique consiste à remplacer le foie cancéreux par un foie sain. La transplantation est le seul traitement curatif à 100 % du CHC dans le cas d'un foie cirrhotique. En effet, elle permet d'enlever la tumeur, de restaurer les fonctions normales de l'organe et surtout de prévenir l'apparition de nouvelles tumeurs dans une certaine mesure [65, 84]. Elle offre une espérance de vie supérieure à 3 ans. Selon la taille du CHC, le pourcentage de récurrence varie entre 10 % pour un petit CHC et 45 % pour un CHC avec de multiples lésions [84]. Le taux de survie est de l'ordre de 50 % après 5 ans pour un CHC de petite taille et de 10 % pour un CHC avec des lésions multiples [84]. Cependant, cette technique n'est pas la plus utilisée en raison du manque de donneurs et des délais de transplantation. En effet, la fréquence des CHC est très largement supérieure à celle du nombre de donneurs [230]. Si le temps moyen d'attente dépasse les 6 mois, le taux de contre-indications à la transplantation ou le taux de mortalité augmente de 23 % jusqu'à 50 % [230]. Afin de pallier au manque d'organes, des transplantations sont effectuées à partir de donneurs vivants [68, 230]. Neuf pourcent des patients sortent des listes d'attente dans les 5 mois. Pour les patients avec un CHC avancé, ce taux atteint 50 % [142]. Pour que les patients restent admissibles à une transplantation, les traitements palliatifs sont utilisés afin de maintenir les fonctions du foie et de contenir la progression du cancer. Ainsi, ce traitement reste confiné à un petit nombre de patients très soigneusement sélectionnés [142].

1.3.2 Résection

Cette technique consiste à enlever par chirurgie la partie du foie cancéreuse. Les fonctions du foie sont assurées par la partie restante de l'organe. La résection est le premier traitement chirurgical du CHC à travers le monde [84]. Lors d'une résection, jusqu'à 80 % de la masse du foie peut être enlevée [11]. Les petites tumeurs, inférieures à 50 mm, sont facilement traitées par résection avec un taux de survie entre 25 % et 67 % à 5 ans [84]. La résection chez des patients ayant des fonctions du foie diminuées (Child-Pugh B et C) ou alors une diffusion de la tumeur est associée avec une mortalité significative [84, 142]. Ainsi, la résection ne peut être effectuée que sur 20 % des patients ayant un CHC, car elle n'est généralement pas tolérée chez les patients atteints d'une cirrhose. Les patients cirrhotiques ne peuvent être soignés par résection seulement s'ils ont des fonctions hépatiques préservées [230].

1.3.3 Ablation

L'ablation est un traitement minimalement invasif qui consiste à appliquer un effet toxique (changement de température ou injection d'une solution alcoolisée principalement) sur la zone cancéreuse. Cependant, l'accès à la tumeur n'est pas toujours possible [230]. L'ablation est présentée dans cette section à travers l'ablation par injection intratumorale transcutanée, par RF et les nouvelles techniques (micro-ondes, cryogénie et électroporation irréversible).

1.3.3.1 Ablation par injection intratumorale

Cette technique consiste à injecter directement au niveau de la masse tumorale une solution, généralement de l'éthanol, permettant de coaguler les tissus tumoraux à travers lesquels elle diffuse. Ce traitement présente une double fonction: (i) il induit une nécrose des cellules néoplasiques et (ii) une nécrose des cellules endothéliales et l'agrégation des plaquettes. Cette agrégation provoque une thrombose des petits vaisseaux conduisant donc à une ischémie du tissu tumoral [142]. L'injection percutanée d'éthanol (IPE) peut être réalisée soit en une ou plusieurs séances. En effet, les tumeurs de moins de 20 mm sont traitées en 3 ou 4 séances, tandis que les tumeurs de 20 à 35 mm sont traitées en 8 à 12 séances. L'IPE était principalement utilisée dans les années 1980 et 1990. Plusieurs études ont indiqué que cette technique était particulièrement

efficace sur les petites tumeurs inférieures à 30 mm avec une réponse tumorale complète pour 90 à 100 % des lésions. Cependant, l'efficacité diminue de façon importante avec l'augmentation de la taille des lésions. En fonction de la taille de la tumeur et de la technique d'injection, le taux de survie à 1, 3 et 5 ans est de 81-97, 42-82 et 14-63 % respectivement [84, 230].

1.3.3.2 Ablation par radiofréquence

L'ablation par RF est un traitement thermique localisé conçu pour détruire la tumeur en chauffant le tissu tumoral à une température supérieure à 50 °C [37, 84, 125, 142]. Cette technique a été introduite dans le milieu des années 1990 comme une pratique clinique routinière. L'ablation est réalisée grâce à une ou plusieurs aiguilles placées au niveau de la tumeur (Figure 1. 7). L'avantage principal de cette technique est d'obtenir une nécrose complète de la tumeur en une seule intervention [84, 230]. Plusieurs études ont démontré son efficacité pour le traitement du CHC [142]. L'ablation par RF est utilisée pour traiter les petites lésions ayant un diamètre compris entre 30 et 40 mm [147]. Généralement, avec cette ablation, le taux de survie à 1; 3 et 5 ans est de 85-100, 46-89 et 31-64 % respectivement. La survie ne dépend pas que de la tumeur mais aussi des fonctions du foie. L'ablation par RF par rapport à l'IPE permet d'obtenir une meilleure réponse tumorale locale, car l'ablation est plus prévisible et contrôlée [142]. De plus, le traitement est réalisé en une seule séance [84]. Par ailleurs, l'ablation par RF est considérée comme équivalente à la résection pour les CHC de moins de 50 mm.

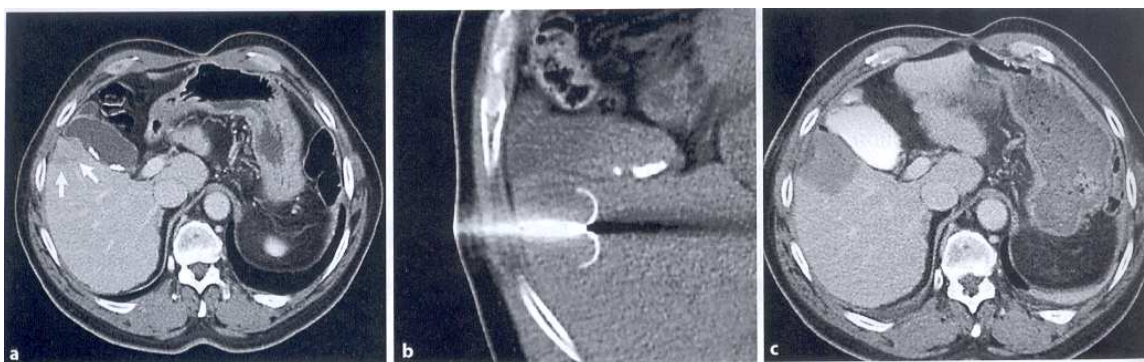


Figure 1. 7: Images CT d'une ablation par RF d'un CHC: (a) lésion hypo-vasculaire située sous la vésicule biliaire, (b) aiguille RF de 35 mm placée dans la tumeur, (c) zone hypo-dense après le traitement recouvrant entièrement la lésion indiquant une nécrose par coagulation [142].

Plusieurs facteurs affectent le volume de nécrose par ablation thermique. Il y a la perte de chaleur due à la perfusion de la zone à traiter, l'énergie appliquée et les interactions locales avec le tissu. L'induction de la chaleur doit être bien contrôlée afin d'éviter tout dommage aux structures hépatiques adjacentes à la zone traitée [142]. Quand la taille de la tumeur augmente, l'efficacité diminue, car le volume d'ablation est inférieur à celui de la tumeur en raison d'une perte de chaleur provoquée par le flux sanguin. L'ablation RF est aussi limitée si la tumeur est en contact avec un vaisseau sanguin.

1.3.3.3 Nouvelles techniques d'ablation

L'ablation par micro-ondes a été développée pour concurrencer l'ablation par RF [16]. Elle permet une zone d'ablation plus grande, une vitesse d'ablation supérieure et une faible perte de chaleur par convection. Actuellement, aucune étude statistique n'a démontré la supériorité des micro-ondes par rapport aux RF. Les micro-ondes pourraient être utilisées pour une ablation d'un CHC de plus de 30 mm [16, 79, 115].

L'ablation cryogénique consiste à placer une aiguille refroidie avec de l'azote liquide dans la tumeur afin de créer une bulle de glace [115]. Un des avantages de la cryoablation est qu'elle permet de générer des zones d'ablation plus larges et plus précises que l'ablation par RF. La formation de la glace peut être suivie de façon très précise par US, CT et IRM [78]. Néanmoins, cette technique est moins utilisée pour le traitement des CHC en raison des complications comme le cryo-choc et la possibilité d'une rupture multiple de l'organe [79]. Cette technique présente aussi de plus grands risques de saignement en raison d'un manque de cautérisation.

L'ablation par électroporation irréversible consiste à augmenter de façon irréversible la perméabilité de la membrane cellulaire en changeant le potentiel transmembranaire. Ceci provoque des perturbations dans l'intégrité de la bicouche lipidique. Les nanopores formés permettent le passage de molécules à travers la membrane cellulaire [69, 115]. Ceci entraîne la mort cellulaire en quelques millisecondes, ce qui n'est pas le cas avec l'ablation thermique (plusieurs minutes voire des heures). La zone traitée peut être parfaitement identifiée grâce à un

modèle mathématique et la connaissance des paramètres appliqués. Un autre avantage de cette technique est que son efficacité n'est pas affectée par la présence de vaisseaux sanguins. La première étude préclinique chez des rats a montré que cette technique a permis une réduction de la taille de la tumeur [69].

1.4 Traitements palliatifs du carcinome hépatocellulaire

Malgré les programmes de surveillance, seulement 30 % des patients ayant un CHC reçoivent des traitements curatifs [230]. La survie des patients ne pouvant recevoir des traitements curatifs est généralement inférieure à six mois [84]. Les traitements palliatifs comme la radiothérapie, l'embolisation intra-artérielle, la radioembolisation et la chimiothérapie sont présentés dans cette section et la chimio-embolisation est décrite dans la suivante.

1.4.1 Radiothérapie

L'irradiation à haute dose est un processus cytotoxique efficace sur les cellules du CHC provoquant une réduction de la zone tumorale. Cependant, cette technique présente de sérieux effets indésirables tels qu'une hépatite, une atrophie lente et progressive du parenchyme hépatique et une insuffisance hépatocellulaire [10, 11, 84]. Les maladies du foie induites par l'irradiation ont lieu quand la dose reçue est supérieure à 30 Gy pendant trois semaines. Ainsi, l'irradiation doit être limitée. Pour augmenter son efficacité, la radiothérapie est couplée avec de la chimiothérapie. Cependant, l'efficacité du traitement reste faible. Une autre approche est la thérapie par irradiation interne ('brachytherapy'). Elle consiste à utiliser une source 10-Ci d'iridium-192 placée à l'extrémité d'un cathéter pour limiter l'irradiation de tout le foie, [161]. Cette technique n'est pas limitée par la taille de la tumeur [191-194]. Afin de préserver le parenchyme du foie, la dose doit être ajustée afin que les 2/3 du tissu sain reçoivent moins de 5 Gy. Les complications sont des saignements, des infections, des abcès occasionnels et des ulcères.

1.4.2 Embolisation intra-artérielle

Cette méthode consiste à injecter un agent embolisant dans l'artère hépatique afin d'occlure les branches nourricières de la tumeur. Ceci entraîne une ischémie des cellules tumorales. L'embolisation chez les patients atteints d'un CHC est basée sur la connaissance de la vascularisation artérielle de la tumeur [230]. Chaque système de vascularisation (veine porte ou artère hépatique) peut alimenter suffisamment le foie dans le cas d'une occlusion [179]. Pour autant, l'embolisation ne doit pas priver tout le foie de sa vascularisation. Ceci provoquerait une nécrose anoxique fatale. De plus, l'embolisation artérielle est contre-indiquée en l'absence d'un flux portal et chez les patients ayant un Child-Pugh C [11]. L'embolisation artérielle donne de meilleurs résultats par rapport à la chimiothérapie intra-artérielle [11]. L'embolisation répétée peut entraîner des complications chirurgicales provenant d'un remodelage de l'artère hépatique ou le développement de chemins de dérivation du réseau vasculaire [188]. De plus, l'embolisation provoque des malaises, de la fièvre et de la douleur localisée [76]. Il est capital d'éviter le passage de l'agent embolisant à travers les artéioles pulmonaires [76]. Les agents embolisants utilisés sont décrits dans la section sur la chimio-embolisation.

1.4.3 Radioembolisation

Ce traitement consiste à injecter des microparticules radioactives dans les artères nourricières de la tumeur afin de réaliser une forte irradiation des nodules tumoraux tout en préservant les tissus sains [107, 108, 199]. Deux produits sont disponibles sur le marché: SIR-Spheres[®] (Sirtex Medical Europe, Bonn, Allemagne) qui sont des microparticules polymères et TheraSphere[®] (MDS Nordion, Toronto, Ontario, Canada) qui sont des microparticules de verre. Ces microparticules utilisent l'isotope radioactif d'yttrium-90 (⁹⁰Y) qui émet des rayons β ayant une demi-vie de 64,2 heures et une pénétration moyenne dans le tissu de 2,5 mm. Dans les 11 jours suivant leur injection, 95 % de la radioactivité est délivrée aux abords des vaisseaux tumoraux. Il existe trois contre-indications absolues pour ce traitement: (i) un shunt hépatopulmonaire pouvant amener plus de 30 Gy dans les poumons en une seule injection ou plus de 50 Gy lors de multiples injections, (ii) l'incapacité de prévenir le reflux des microsphères dans le tractus gastro-intestinal et (iii) une irradiation importante du patient. Les contre-indications relatives sont des fonctions pulmonaires compromises et des fonctions hépatiques

inadéquates [200]. Contrairement à l'embolisation, les effets secondaires à la fin de l'intervention sont moindres (douleur moyenne et fièvre), car il n'y a pas de macro-effets d'embolisation [202]. Même si le traitement est bien toléré, il peut induire des effets toxiques importants dans les organes non ciblés (colon, poumons, intestins) et aussi dans le foie [24, 39, 61]. Les dommages au foie apparaissent 4 à 8 semaines après l'injection sous la forme d'une jaunisse ou d'ascites [201]. L'utilisation de ces petites microparticules embolisantes risque d'augmenter le taux d'embolisation des capillaires non tumoraux [14, 190]. Ainsi, les microparticules radioembolisantes doivent être injectées par cathéter de manière très sélective au niveau de la tumeur. Une modélisation de la distribution de ces microparticules à travers plusieurs bifurcations a mis en évidence leur perte dans les vaisseaux sanguins sains adjacents à la tumeur [8, 98]. Un effet significatif sur le contrôle de la croissance de la tumeur a été observé avec cette approche. Cependant, le taux de réponse reste entre 20 et 47 %. Par ailleurs, des microparticules de poly(acide lactique) (PLA) ($\varnothing = 30 \mu\text{m}$) chargées d'holmium-166 ont permis une radioembolisation sans effets secondaires dans un porc à l'aide d'une administration contrôlée [231].

1.4.4 Chimiothérapie

Cette section commence par la chimiothérapie systémique et se poursuit avec la chimiothérapie ciblée.

1.4.4.1 Chimiothérapie systémique et artérielle

La chimiothérapie systémique consiste à administrer plusieurs fois, soit par voie orale ou intraveineuse, un agent anticancéreux pour tuer ou limiter le développement des cellules tumorales. La mitomycine C, la doxorubicine (DOX), le cisplatine et la mitoxantrone sont les antinéoplasiques ayant les taux de réponse les plus élevés. Néanmoins, ce taux est généralement inférieur à 20 % [84]. De plus, la réponse ne dure que de un à deux mois, ce qui n'affecte pas l'espérance de vie du patient. La doxorubicine est l'agent le plus utilisé cliniquement. Cependant, une réponse n'est obtenue que chez 10 % des patients sans amélioration du taux de survie. Les autres agents injectés seuls ou en combinaison ont montré aussi des résultats médiocres. Ainsi, le

CHC est une tumeur avec une résistance élevée à la chimiothérapie [172, 176, 243]. De plus, la cirrhose et le dysfonctionnement hépatique compliquent l'administration des thérapies systémiques. Par conséquent, aucune chimiothérapie traditionnelle n'a permis d'obtenir des bénéfices cliniques ou le prolongement de la survie chez des patients avec des CHC avancés [27, 131, 136].

Différentes stratégies ont été évaluées afin d'améliorer la distribution de l'agent anticancéreux. La DOX a été couplée avec de la galactosamine à un polymère afin de cibler le foie [210]. Cependant, seulement 16 % de la dose administrée se retrouve dans le foie et 3 % de la dose est libérée dans la tumeur. Aussi, les agents anticancéreux sont injectés soit sous forme de bolus ou sous forme de perfusion dans l'artère hépatique par cathéter afin d'accroître leur concentration dans la zone cancéreuse. L'administration régionale permet d'obtenir de meilleurs résultats, mais la médiane de survie reste cependant courte [84, 157]. Avant les chimiothérapies ciblées, aucune des thérapies systémiques ne pouvait être considérée comme un traitement standard pour les patients avec un CHC avancé (Figure 1. 5).

1.4.4.2 Chimiothérapie systémique ciblée

Une amélioration des connaissances au niveau moléculaire sur le CHC a ouvert de nouvelles voies pour développer des chimiothérapies plus ciblées [53, 55, 56, 83, 224, 232, 243]. La pathogenèse moléculaire du CHC implique différentes aberrations et altérations génétiques dans les chemins de signalisation [36, 55, 224, 232]. Par conséquent, il n'existe pas un seul mécanisme moléculaire dominant [74]. Différentes voies de signalisation comme la voie Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) et la phosphoinositol 3-kinase ont été identifiées dans les mécanismes de la prolifération des cellules tumorales et de l'angiogenèse. L'angiogenèse joue un rôle important, car le CHC est une tumeur très vascularisée. Ainsi, l'identification des facteurs/récepteurs de croissance et d'angiogenèse comme 'vascular endothelial growth factor' (VEGF), 'platelet-derived growth factor' (PDGF) et 'epidermal growth factor receptor' (EGF) constituent de nouvelles cibles pour les formulations thérapeutiques. Plusieurs formulations ont été développées basées sur ces facteurs et récepteurs (Tableau 1. 5) et évaluées cliniquement [243].

Tableau 1. 5: Ciblage des nouvelles formulations pour le traitement systémique des CHC [243]

	Mode d'action	Cible	Toxicités majeures de niveau 3 et 4
Agents anti-angiogénèses			
Bevacizumab	ACM	neutralisation du VEGF	hypertension, saignement, thrombose, protéinurie
Inhibiteurs multi-kinases			
Sorafenib	ITK	VEGFR-2/-3, PDGFR- β , Raf-1, B-Raf, Flt-3, c-KIT, RET	diarrhée, réaction sur la peau des pieds et des mains, perte de poids, hypophosphatémie
Sunitinib	ITK	VEGFR-1/-2, PDGFR- α , - β , Flt-3, c-KIT, RET	thrombocytopénie, rougeur, neutropénie, symptômes du système nerveux central, asthénie, hémorragie, fatigue, hypertension, taux élevé des enzymes du foie, diarrhée
Inhibiteurs EGFR			
Cetuximab	ACM	EGFR/ErbB1/Her1 neutralisation	taux élevé des enzymes du foie, fièvre
Erlotinib	ITK	EGFR/ErbB1/Her1	diarrhée, fatigue, altérations de la peau, thrombocytopénie
Gefitinib	ITK	EGFR/ErbB1/Her1	neutropénie, rougeur, diarrhée
Lapatinib	ITK	EGFR/ErbB1/Her1, EGFR/ErbB2/Her2/Neu	fatigue, diarrhée, taux élevé des enzymes du foie

ACM = anticorps monoclonaux, ITK = inhibiteur de la tyrosine-kinase, VEGF(R) = 'vascular endothelial growth factor' (receptor), PDGF(R) = 'platelet-derived growth factor' (receptor), c-KIT = 'stem-cell factor receptor', Flt-3 = 'FMS-like tyrosine kinase-3', RET = 'glial cell line-derived neurotrophic factor receptor', EGF(R) = 'epidermal growth factor (receptor)', ErbB1/Her1 = 'human epidermal growth factor receptor 1', Her/Neu = 'human epidermal growth factor receptor 2.'

Plusieurs études de phases I et II ont montré des résultats encourageants en terme de survie, de prolongation du temps avant progression ('time to progression' (TTP)) et de stabilité de la maladie ('disease stability' (DS)). Cependant, le taux de réponse reste modeste (< 10 %).

Actuellement, l'agent le plus prometteur est le sorafenib. Il est testé dans de nombreuses études cliniques de phase I à III. Le sorafenib, commercialisé sous le nom Nexavar[®] (Bayer, Allemagne), est un agent oral inhibiteur multikinase qui bloque la prolifération cellulaire et l'angiogénèse. Il cible les kinases sérine/thréonine Raf-1/B-Raf et la tyrosine-kinase VEGFR-2/-3 et PDGFR- β [130, 240]. Le sorafenib a été le premier agent oral permettant une augmentation significative de la durée de vie des patients ayant un CHC avancé [133]. En 2007, le sorafenib a été autorisé à être utilisé comme traitement de choix pour les CHC avancés en Europe et aux États-Unis. D'autres agents comme le sunitinib et le bevacizumab sont évalués dans des essais cliniques [243].

1.5 Chimio-embolisation

La chimio-embolisation est présentée dans cette section à travers son principe, les agents anticancéreux et embolisants, les microparticules à élution d'un agent anticancéreux, ses limitations et sa combinaison avec d'autres traitements.

1.5.1 Principe

La chimio-embolisation consiste à injecter un agent anticancéreux par voie intra-artérielle (chimiothérapie) suivi d'un agent embolisant (Figure 1. 8). La chimio-embolisation transartérielle (CETA) permet de délivrer efficacement des doses hautement concentrées d'agents anticancéreux dans le lit de la tumeur tout en épargnant le parenchyme hépatique avoisinant [124, 144]. L'embolisation, en réduisant le flux sanguin au niveau de la tumeur permet de minimiser la quantité d'agent anticancéreux rejoignant la circulation systémique. Cette technique a été étudiée depuis plus de 20 ans. C'est en 2002 qu'il a été démontré que la CETA améliorait le taux de survie par rapport aux meilleurs soins de soutien ('best supportive care'). Elle est actuellement considérée comme la procédure courante pour le traitement du cancer primaire et secondaire du foie ne pouvant être soigné par des traitements curatifs [124].



Figure 1. 8: Images IRM et angiographiques d'une chimio-embolisation d'un grand CHC : (a) IRM du CHC situé dans le lobe gauche, (b) CHC hyperintense lors d'une séquence IRM de diffusion, (c) IRM du CHC avec une séquence avec un faible coefficient de diffusion, (d) angiographie obtenue par injection sélective d'agent de contraste dans l'artère hépatique montrant une hypertrophie de l'artère hépatique gauche, (e) angiographie montrant des nodules de CHC hypervasculaires envahissant tout le lobe gauche, (f) angiographie de contrôle après la chimio-embolisation avec une injection d'une solution de lipiodol-DOX suivie de microparticules Embospheres 300-500 μ m. L'angiographie montre une embolisation distale presque complète des branches de l'artère hépatique gauche et une déposition diffuse du lipiodol dans les nodules CHC, (g) image CT 1 mois après la CETA montrant l'accumulation de matériau dense dans le CHC, (h) IRM 1 mois après la CETA montrant une perte de contraste (flèches). Néanmoins, aucune réduction de la taille n'est remarquée. (i) et (j) IRM de diffusion montrant une zone tumorale ne répondant pas au traitement (flèches) et une nécrose (tête de flèche). Ceci indique une réponse partielle au traitement [144].

Les patients atteints d'un CHC de type Child-Pugh A ou B et avec plus de trois nodules CHC peuvent être traités par chimio-embolisation (Figure 1. 5). Ce traitement s'applique aux patients avec des fonctions du foie préservées sans invasion extrahépatique. La CETA est utilisée avec pour but d'améliorer la survie et le maintien de la qualité de vie sans intention de guérir.

Bien que cette technique soit généralement pour des patients avec des CHC avancés, elle peut être utilisée pour des CHC précoces qui présentent des contre-indications pour les thérapies radicales. La CETA est aussi utilisée pour les patients cirrhotiques en attente d'une transplantation pour réduire le risque de progression de la tumeur [144]. Les contre-indications pour la CETA sont des fonctions hépatiques très diminuées. Les patients Child-Pugh C ne peuvent pas recevoir ce traitement [144].

À travers le monde, il n'existe pas de consensus sur le mode opératoire [144]. Avant de réaliser une CETA, des séquences d'imagerie du foie sont effectuées (généralement en IRM). Ceci permet de déterminer la configuration de la tumeur et d'obtenir une ligne de base pour suivre sa nécrose (Figure 1. 8). Un mois après l'intervention, un examen clinique permet d'évaluer l'état du patient et de prendre la décision sur la nécessité d'une seconde séance de traitement. La vascularisation tumorale et les changements microstructuraux sont évalués afin d'estimer la nécrose de la tumeur et donc l'efficacité de l'intervention (Figure 1. 8). La réponse thérapeutique est meilleure quand la CETA peut être répétée plusieurs fois en maintenant une perméabilité artérielle sur une longue période [52, 124]. La décision de retraiter le patient est basée sur une combinaison de paramètres: (i) la tolérance à la CETA, (ii) les analyses biochimiques et (iii) le suivi en imagerie. Ainsi, les syndromes de post-embolisation doivent être minimales afin de réaliser des traitements ultérieurement. Le taux de survie à 1, 2 et 3 ans est de 57 %, 31 % et 26 % respectivement [134].

La réussite d'une chimio-embolisation dépend du positionnement du cathéter pour l'injection de l'agent thérapeutique et embolisant [18]. La CETA doit être ciblée afin de limiter les effets secondaires [135]. Le positionnement du cathéter détermine la proportion de foie embolisé [146]. Ainsi, la chimio-embolisation transartérielle super sélective (CETAS) a été développée. Elle consiste à placer un microcathéter dans les branches artérielles hépatiques nourrissant la tumeur. Ceci permet de minimiser l'occlusion du flux sanguin dans le foie et elle augmente l'efficacité du traitement par rapport à une CETA [44]. Malheureusement, le positionnement du cathéter de façon super sélective ne peut pas être toujours réalisé à cause de la configuration du réseau vasculaire tumoral (Figure 1. 9). De plus, le placement du cathéter dans

les petites artères peut provoquer des spasmes qui vont empêcher le flot sanguin de transporter l'agent embolisant vers la lésion [60]. Il faut aussi veiller à ce que le placement du cathéter ne provoque pas un reflux des microparticules.



Figure 1. 9: Angiographie d'une CETA montrant une tumeur hypervascularisée avec des vaisseaux anormaux (à gauche) et un cathéter (à droite, en blanc) placé de façon très distale de la tumeur [79].

1.5.2 Agents anticancéreux

L'agent anticancéreux le plus utilisé est la doxorubicine et aussi une combinaison de cisplatine, de doxorubicine et de mitomycine C [52, 124, 179]. Généralement, l'agent anticancéreux est émulsifié avec du lipiodol, une huile iodée afin d'améliorer sa rétention au niveau de la tumeur [230]. Ensuite, un agent embolisant est injecté rapidement pour réduire le flux sanguin vers la tumeur. Ceci permet aussi de maintenir l'émulsion entre l'agent anticancéreux et le lipiodol.

1.5.3 Vecteurs embolisants

Différents agents embolisants ont été utilisés. L'artère hépatique a été ligaturée avec des spirales métalliques en acier inoxydable ayant un diamètre entre 2 à 10 mm [179]. Cependant, plusieurs effets secondaires comme une nécrose hépatique, une hépatite ou une rupture hépatique ont été constatés [179]. Un matériau spongieux en gélatine, soit sous forme de poudre dont le diamètre variait entre 40 et 60 μm , soit sous forme de petits cubes de 0,5 à 1 mm de côté, a été

utilisé comme agent embolisant [109]. Ce matériau a permis une occlusion temporaire entre 2 à 4 semaines. L'embolisation a été réalisée avec des caillots de sang [109]. Ces caillots, n'augmentaient pas l'efficacité thérapeutique par rapport à une embolisation réalisée avec des cubes spongieux.

Tableau 1. 6: Microparticules utilisées pour l'embolisation du foie [99]

Microparticules (compagnie)	Taille (µm)	Composition	Remarques
PVA (Cook)	180-300 / 300-500 500-710 / 710-1000	PVA macroporeux	distribution de taille large, tendance à l'agrégation pouvant entraîner des difficultés d'injection
Contours SE (Boston Scientific)	300-500 / 500-700 700-900	PVA sphérique	manque de flexibilité et d'élasticité, déformation sous contrainte mécanique
Bead block (Biocompatible UK)	100-300 / 300-500 500-700 / 700-900		très flexible et compressible
DC Bead (Biocompatible UK)	100-300 / 300-500 500-700 / 700-900	polymère de PVA modifié avec des groupes sulfonates	légère diminution du diamètre lors du chargement en DOX (25 mg/mL)
Embosphere (BioSphere Medical)	40-120 / 100-300 300-500 / 500-700 700-900 / 900-1200	gélatine tris-acryle	surface hydrophile et forme sphérique qui préviennent l'agrégation
HepaSphere (BioSphere Medical)	200-400 / 400-600 600-800		augmentation de 4 fois du diamètre à l'état sec lors d'un contact avec une solution saline
Embozene (CeloNova)	100 / 250 / 400 500 / 700 / 900	microparticules polymériques recouvertes du polymère Polyzene-F	distribution de taille bien contrôlée
LC Bead (Biocompatibles Inc and RITA)	100-300 / 300-500 500-700 / 700-900	hydrogel	microparticules colorées

De nos jours, l'embolisation est généralement réalisée avec des microparticules. L'utilisation des microparticules date du milieu des années 1980 [60, 126]. Plusieurs compagnies

ont commercialisé des microparticules qui présentent des propriétés différentes: biodégradables ou pas, déformables, et à élution d'agents anticancéreux (Tableau 1. 6) [126]. Les Embospheres sont des microparticules faites d'un copolymère acrylique réticulé avec de la gélatine (gélatine tris-acryle). Une étude préliminaire a indiqué que ces microparticules permettaient une meilleure rétention de l'agent anticancéreux au niveau de la tumeur par rapport à des microparticules de poly(alcool de vinyle) (PVA), car l'occlusion des vaisseaux sanguins était plus précise [81]. Cette meilleure occlusion fut attribuée à la sphéricité des microparticules. Néanmoins, l'espérance de vie avec ces deux types de microparticules était la même. Il a montré que des microparticules (Embospheres) d'un diamètre entre 100-300 μm optimisaient l'embolisation de la tumeur [1].

1.5.4 Microparticules à élution d'un agent anticancéreux

Des microparticules à élution d'un agent anticancéreux sont des microparticules embolisantes libérant progressivement l'agent cytotoxique. Pour la CETA, elles permettent de réaliser le traitement en une seule injection. La libération progressive de l'agent thérapeutique une fois l'embolisation effectuée a permis d'augmenter la rétention de l'agent anticancéreux au niveau de la tumeur et de minimiser sa concentration dans la circulation systémique [119, 223, 229]. Ceci a permis de diminuer les effets cytotoxiques de la CETA provoqués par la distribution systémique de l'agent anticancéreux [62, 229]. En effet, lors d'une CETA, le temps entre l'injection de l'agent anticancéreux et l'injection de l'agent embolisant permettait d'en retrouver une quantité non négligeable dans la circulation systémique. Ces microparticules sont autorisées aux États-Unis par la 'Food and Drug Administration' (FDA) pour des essais cliniques pour le traitement des tumeurs hypervasculaires [118]. Les DEB de la compagnie Biocompatible (Tableau 1. 6) sont commercialisées en Europe. Elles sont de plus en plus utilisées. Elles permettent aussi le développement d'un protocole de radiologie interventionnelle conventionnel entre les différents hôpitaux.

La libération de l'agent anticancéreux dépend de la taille des microparticules: plus la taille diminue et plus la concentration plasmatique de cet agent augmente en raison d'une plus grande surface de contact avec le sang [127]. Les DEB sont principalement chargées avec de la DOX, mais aussi avec de l'irinotecan pour le traitement des métastases colorectales dans le foie [54,

223]. Une étude chez un modèle porcin a mis en évidence que les DEB ayant un diamètre entre 100-300 μm induisaient une plus grande nécrose du tissu que les DED avec un diamètre de 700-900 μm [171]. Aussi, la diffusion de la DOX a été observée dans le tissu sur plusieurs centaines de micromètres pendant au moins trois mois.

Plusieurs études ont confirmé des résultats prometteurs pour les DEB [189]. Une étude chez des patients ayant un CHC Child-Pugh A a comparé un traitement par des DEB ($\varnothing = 500\text{-}700\text{ }\mu\text{m}$) contenant de la DOX avec une CETA classique (émulsion de doxorubicine avec du lipiodol suivie par une embolisation avec des cubes spongieux en gélatine). La concentration maximale (C_{max}) dans le sang a été atteinte dans les 5 min après l'injection pour les deux traitements. Cependant, le C_{max} était 10 fois plus faible avec les DEB par rapport à la CETA classique. Le meilleur profil de libération obtenu avec les DEB offre l'opportunité d'augmenter la dose d'agents anticancéreux et de réduire la toxicité du traitement. En réduisant les effets secondaires, le traitement peut être répété plus facilement. Enfin, une étude clinique a comparé les DEB à des microparticules embolisantes (BeadBlock) [143]. Les DEB ont permis une meilleure réponse locale (26,8 % contre 14 % pour une réponse complète à 6 mois, réponse partielle: 46,3 % contre 41,9 %), une diminution de la récurrence à 9 et 12 mois (45,7 % contre 78,3 %) et une diminution de la progression de la tumeur (42 semaines contre 36 semaines).

Sur le même principe, des microparticules à base d'amidon ont été étudiées [179]. Elles ont été vite dégradées par le sérum d'amylase entraînant une libération rapide de l'agent anticancéreux. Des microparticules de poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) ont été testées chez l'animal pour la chimio-embolisation [9, 187]. La première étude a déterminé le diamètre optimum des particules pour l'embolisation complète des vaisseaux sanguins [9]. La deuxième étude a présenté la libération contrôlée et progressive de mitomycine permettant de limiter la croissance de la tumeur [187]. De nouvelles microparticules à élution QuadraSpheres (Biosphere Medical, Rockland, États Unis) ont été évaluées chez le lapin [113]. Ces microparticules augmentaient en taille lorsqu'elles étaient en contact avec une solution saline. Cette propriété a permis d'améliorer leur injection à travers le cathéter et aussi leur distribution intravasculaire. Ces microparticules ont présenté un profil pharmacocinétique sécuritaire et un effet antitumoral.

1.5.5 Limitations

La CETA provoque de sérieux effets secondaires comme de fortes fièvres, des douleurs abdominales et de l'anorexie chez une très grande majorité des patients (60 à 90 %) [18, 84, 109, 124, 134]. Par conséquent, une injection de médicaments antidouleurs est effectuée avant et après le traitement. Aussi, les patients peuvent développer un abcès hépatique après la nécrose de la tumeur [229]. Une sténose hépatique ou la formation d'un pseudo anévrisme dans l'artère hépatique peut avoir lieu avec la manipulation du cathéter [124]. Une posologie excessive de l'agent anticancéreux peut provoquer l'apoptose des hépatocytes normaux [122]. En outre, même l'utilisation des DEB a entraîné un certain nombre d'abcès dans le foie. L'injection de ces microparticules dépend du radiologue et doit être ciblée et contrôlée [127].

1.5.6 Combinaisons avec d'autres traitements

Il est possible de combiner plusieurs méthodes décrites précédemment avec la chimio-embolisation pour accroître l'efficacité thérapeutique. En effet, la chimio-embolisation a été combinée avec l'injection percutanée d'éthanol ou l'ablation par RF [238]. En réduisant le flux sanguin, l'embolisation a permis d'augmenter la quantité d'éthanol retenue au niveau de la zone tumorale. Elle a contribué à accroître le volume d'ablation par RF, car le refroidissement par la vascularisation tumorale était minime. Une autre combinaison, en cours d'étude, est la CETA avec les agents de la chimiothérapie ciblée comme le sorafenib. L'étude de phase II 'SPACE' consiste à évaluer la progression de la tumeur avec une CETA et l'injection de sorafenib [115, 126].

1.6 Agents magnétiques pour le carcinome hépatocellulaire

Cette section présente l'utilisation des matériaux superparamagnétiques et ferromagnétiques pour le diagnostic et le traitement du CHC.

1.6.1 Diagnostic

Cette section décrit d'abord les formulations commerciales de nanoparticules d'oxyde de fer puis les formulations en cours de développement.

1.6.1.1 Nanoparticules d'oxyde de fer commerciales

Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, séquestrées par les cellules de Kupffer, produisent des effets de relaxation en T1, T2 et T2* dans le parenchyme [221]. Les gradients magnétiques, créés par les particules, contribuent au déphasage des protons et entraînent une importante relaxation en T2/T2*. L'augmentation du signal avec les nanoparticules SPIO dépend des effets de susceptibilité qui varient selon les séquences. C'est pourquoi le choix de la séquence est critique et l'optimisation de ces paramètres est nécessaire pour maximiser la détection des lésions. Par ailleurs, selon leur stade de différenciation, les tumeurs malignes ne possèdent pas de cellules de Kupffer. Ainsi, les nanoparticules n'induisent pas d'effet dans la tumeur. Il en résulte une augmentation du contraste avec le parenchyme (Figure 1. 10).

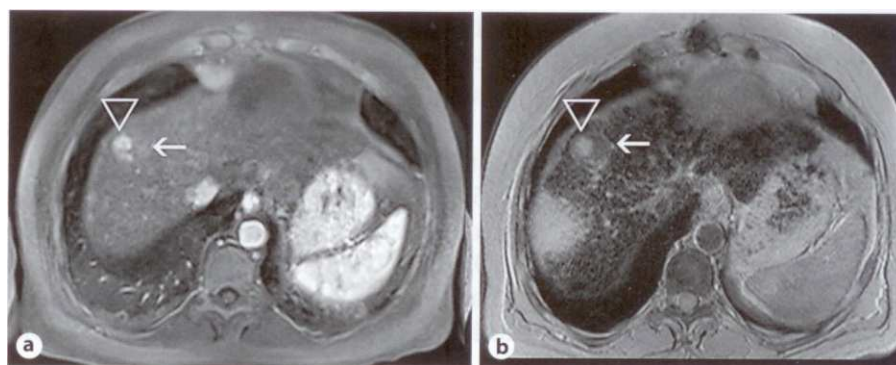


Figure 1. 10: Imagerie d'un CHC avec (a) un rehaussement au gadolinium lors de la phase artérielle et (b) avec des nanoparticules d'oxyde de fer [247].

Généralement, les nanoparticules SPIO sont des agglomérats de cristaux d'oxyde de fer recouverts de dextran ou de carboxydextran. Leur taille varie entre 60 et 250 nm. Deux formulations de nanoparticules SPIO sont disponibles commercialement [221]. Après la phagocytose, les particules sont biodégradées et incorporées aux réserves en fer de l'organisme. Une étude a montré que le contraste entre la tumeur et le parenchyme était affecté par l'agrégation des nanoparticules [48]. L'IRM avec injection de nanoparticules SPIO a permis d'augmenter le nombre de nodules détectés et d'améliorer la limite de détection de lésion à 3 mm. La détection avec les nanoparticules SPIO a été comparée avec un CT dynamique et un IRM dynamique (injection de gadolinium) (Tableau 1. 7). La détection fut meilleure par rapport au CT et légèrement plus basse par rapport à l'IRM dynamique, spécialement pour les petits CHC [236]. Par conséquent, pour optimiser la détection, l'examen IRM doit être réalisé avec une injection de gadolinium et de nanoparticules SPIO. Par ailleurs, un autre avantage de l'utilisation de ces nanoparticules est pour la caractérisation de différents nodules, qui selon leur nature, maintiennent une activité phagocytaire [66, 222, 233, 234].

Tableau 1. 7: Étude comparative du taux de détection d'un CHC hypervasculaire chez les mêmes patients [221]

CHC	CT dynamique	IRM dynamique	IRM-SPIO
Ø < 1 cm (n = 29)	12 (41%)	23 (79%)	20 (69%)
Ø ≥ 1 cm (n = 43)	38 (88%)	41 (95%)	42 (98%)
Total (n = 72)	50 (69%)	64 (89%)	62 (86%)

L'utilisation des nanoparticules SPIO présente aussi des contraintes. Tout d'abord, la diminution de l'intensité du signal dans un foie cirrhotique est limitée en raison de son inhomogénéité structurelle et fonctionnelle [51, 220]. Une autre limitation est l'incapacité de caractériser la vascularisation des lésions. En effet, la perfusion avec les nanoparticules SPIO est toujours en cours de développement [221]. Enfin, les produits de dégradation des nanoparticules (ferritine et/ ou hémossiderine), compartimentés dans les cellules, entraînent une perte de signal qui est détectable sur une période supérieure à celle de la demi-vie de l'agent de contraste [17, 34, 35]. Ainsi, les nanoparticules SPIO Resovist® (Bayer, Allemagne) peuvent montrer un effet en imagerie sur plusieurs semaines [184].

1.6.1.2 Formulations en développement

Des nanoparticules SPIO ($\varnothing = 25$ nm) ont été fonctionnalisées avec un anticorps SM5-1 humanisé [105]. Cet anticorps présentait une très grande spécificité pour les cellules du CHC. Ainsi, les nanoparticules se sont accumulées préférentiellement dans les cellules tumorales entraînant une forte diminution de l'intensité du signal en T2. Des nanoparticules biodégradables, composées de nanoparticules d'oxyde de fer encapsulées dans du PLGA avec une couronne de chitosane-glycol, ont été dégradées progressivement dans les lysosomes [114]. Ceci permit de réduire la durée de l'effet en T2*. La ligne de base en imagerie a été retrouvée après plus de 4 semaines. Des nanoparticules d'oxyde de fer, encapsulées avec un copolymère biodégradable de poly(acide lactique) (PLA) et 'D- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate' (TPGS), ont montré une meilleure dégradation dans le foie par rapport aux nanoparticules Resovist® [184]. La clairance en imagerie fut réalisée en moins de 24 heures.

1.6.2 Traitements

Les traitements sont décrits à travers deux catégories: le ciblage magnétique et l'hyperthermie. Le ciblage magnétique regroupe les interventions utilisant des matériaux magnétiques pour suivre ou cibler le traitement. L'hyperthermie consiste à augmenter la température d'un corps ou d'un milieu grâce à des particules magnétiques placées dans un champ magnétique alternatif. L'hyperthermie est étudiée comme une solution alternative à l'ablation thermique pour accroître son efficacité et contrôler la distribution de chaleur [227]. L'hyperthermie est présentée à travers les microparticules et les nanoparticules utilisées.

1.6.2.1 Ciblage magnétique

1.6.2.1.1 Cathéters

Pour les traitements par voie intra artérielle, le positionnement du cathéter est fait sous rayons X. Durant cette procédure, le foie est irradié plusieurs fois. Cependant, l'irradiation n'est pas toujours possible en raison de la faible tolérance des hépatocytes aux rayons X [126]. Ainsi,

une équipe a étudié le positionnement d'un cathéter en IRM [209]. Des bagues en oxyde de dysprosium ont été mises à l'extrémité du cathéter et sur le guide. Ce matériau provoqua une perte du signal en IRM. Le positionnement du cathéter au niveau de l'artère hépatique commune, droite et gauche dans un porc a été réalisé (Figure 1. 11). Néanmoins, le suivi du cathéter fut difficile surtout en raison d'artefacts de mouvement créés par la respiration de l'animal.

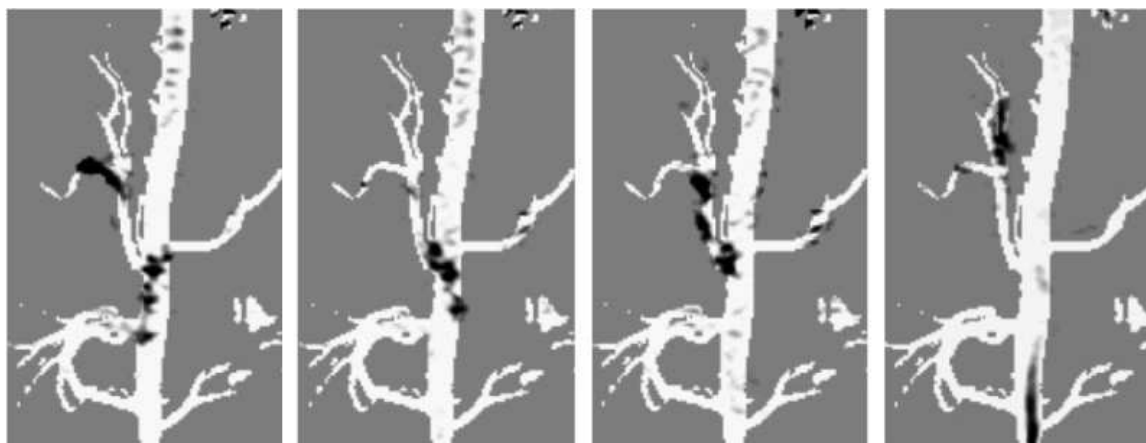


Figure 1. 11: Images du placement progressif d'un cathéter guidé sous IRM depuis l'aorte jusqu'à l'artère hépatique gauche en passant par l'artère hépatique commune. Les quatre bagues magnétiques sur le cathéter créent des artefacts noirs [209].

1.6.2.1.2 Microparticules

Cette section commence par les microparticules chargées avec des nanoparticules magnétiques pour les suivre en IRM. Des microparticules radioactives ^{90}Y ont été marquées avec des nanocristaux d'oxyde de fer [70]. Les microparticules magnétiques ont créé des artefacts caractéristiques sur les images (Figure 1. 12). La déposition de ces microparticules dans une tumeur du foie a pu être suivie en temps réel avec une séquence T2*. Des microparticules embolisantes de gélatine tris-acryle ($\varnothing = 100\text{-}300\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing = 300\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing = 500\text{-}700\text{ }\mu\text{m}$, $\varnothing = 700\text{-}900\text{ }\mu\text{m}$) ont été chargées avec des nanoparticules SPIO [170]. Le taux de détection des microparticules dépendait du nombre et de la taille des particules. Quand plus de 3 particules étaient groupées, elles étaient détectées peu importe leur taille. La détection d'une microparticule ayant un diamètre entre $100\text{-}300\text{ }\mu\text{m}$ n'était possible que dans 29 % des cas. *In vivo*, la détection dépendait du volume de microparticules injectées. Une autre équipe a chargé des microparticules de gélatine tris-acryle ($\varnothing = 100\text{-}300\text{ }\mu\text{m}$, $\varnothing = 300\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$) avec des nanoparticules d'oxyde de

fer pour suivre en IRM l'embolisation d'une tumeur VX2 implantée chez le lapin [112]. Les microparticules ont été imagées avec une séquence T2*. Le taux de détection était de 100 %. Les microparticules 100-300 μm se sont plus déposées à l'intérieur et près de la tumeur.

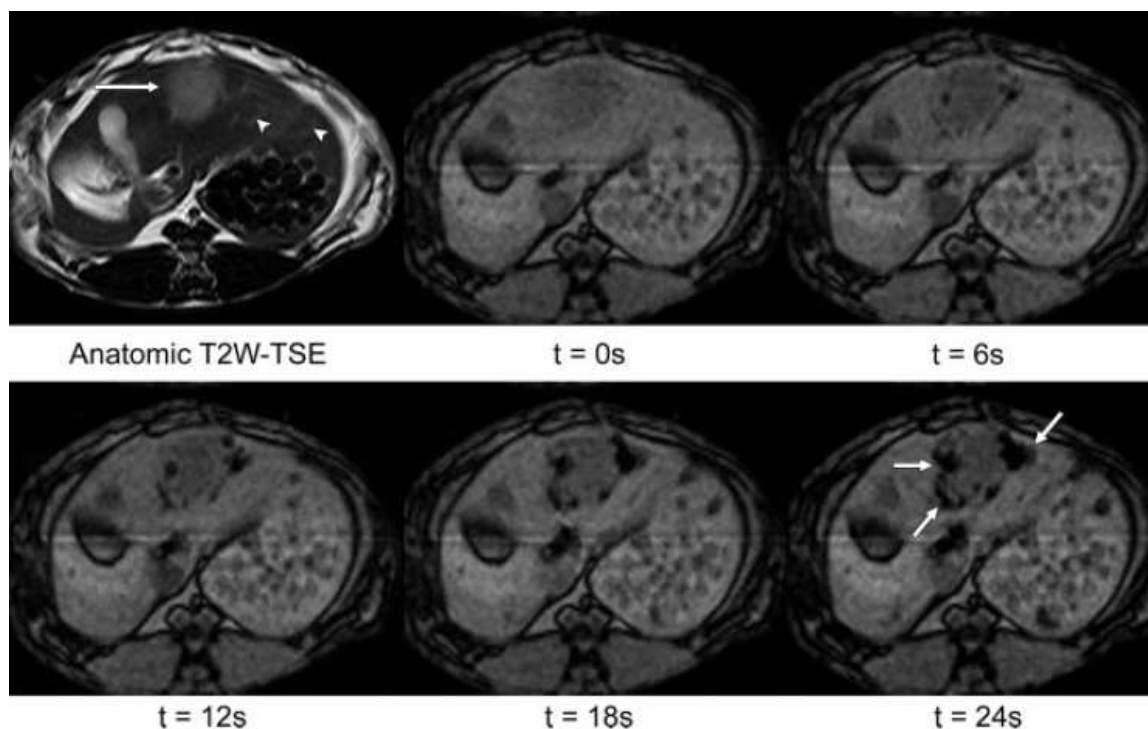


Figure 1. 12: Accumulation progressive des microparticules radioactives magnétiques dans une tumeur (grande flèche) du foie suivie en IRM avec une séquence GRE T2*. Les têtes de flèches indiquent les branches distales de l'artère hépatique [70].

Le ciblage magnétique du CHC avec un champ magnétique externe a été développé par la compagnie FeRx (San Diego, États Unis) [63, 64, 197, 198]. Dans ce projet, des microparticules de fer ($0,5 < \varnothing < 5 \mu\text{m}$) avec de la DOX adsorbée à la surface ont été utilisées. Ces microparticules étaient injectées par un cathéter dans la vascularisation hépatique et elles étaient piégées au niveau de la tumeur grâce au champ magnétique généré par un aimant externe (Figure 1. 13) [198]. Le champ magnétique permettait l'extravasation des microparticules à travers la paroi vasculaire. Ceci entraîna une localisation et une rétention dans le tissu au niveau la zone tumorale [64]. La rétention au niveau du site d'intérêt jouait un rôle clé pour améliorer l'efficacité thérapeutique.

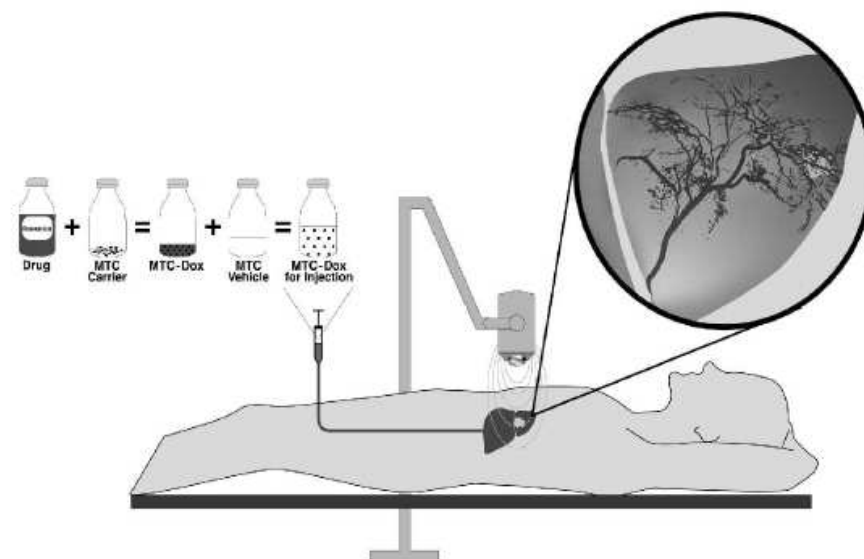


Figure 1. 13: Principe de fonctionnement du traitement du CHC par piégeage avec un champ magnétique externe de microparticules contenant de la DOX [197].

Les microparticules étaient fabriquées par broyage avec du carbone pour obtenir un ratio Fe:C de 75:25 et sans oxydes de fer ou de cémentite (Fe_3C) [63]. La magnétisation à saturation atteignait 175 emu g^{-1} [198]. La force du champ magnétique au niveau du site ciblé variait entre 250 à 1000 G. Le chargement en DOX variait entre 6 à 12 % (m/m) [198]. La DOX était libérée par désorption de la surface en deux heures [197]. Cette méthode devait permettre de réduire la quantité de DOX circulant dans le sang [64]. Ces microparticules ne provoquaient pas d'embolie de la tumeur. Par ailleurs, d'autres agents anticancéreux comme la mitomycine C, la camptothécine, le methotrexate pouvaient être utilisés [197]. Ces microparticules pouvaient aussi adsorber un agent radioactif (rhénium-188) pour la radiothérapie [71]. Le piégeage magnétique devait permettre de limiter l'irradiation des tissus sains. Une expérience *in vitro* a montré qu'avec un champ de 100 G, obtenu en plaçant l'aimant à une distance de 12 cm, il était possible de capturer 90 % des microparticules circulant dans une solution de glycérol à 35 % avec une vitesse d'écoulement de $0,2 \text{ cm s}^{-1}$.

La procédure chirurgicale consistait à placer le cathéter le plus près possible du CHC afin que le maximum de microparticules soit retenu [64]. Ainsi, le cathéter devait être placé dans

chaque branche alimentant la tumeur et l'aimant devait être ainsi repositionné à chaque fois [241]. Néanmoins, si le cathéter n'était pas placé correctement, la quantité de tissu sain affecté par le traitement augmentait. De plus, la durée de la procédure chez un patient était entre 3 à 6 heures (maintien de l'aimant pendant 30 min, positionnement du cathéter, et placement de l'aimant) [241]. Le temps d'exposition aux rayons X était élevé. Enfin, les microparticules se retrouvaient hors du foie, plus particulièrement dans la rate et le parenchyme des poumons [64, 241]. Ces microparticules ont été marquées avec de l' ^{90}Y et évaluées chez le lapin [102]. Une nécrose de la tumeur a été obtenue. Cependant, la partie du foie non ciblée présente un taux de radiation élevé. Ceci indiquait la présence des particules dans le lobe non ciblé malgré un placement du cathéter dans le lobe à traiter. En dépit de bons résultats précliniques et quelques résultats cliniques, l'étude clinique de phase II a été interrompue en raison d'un manque d'efficacité.

1.6.2.1.3 Nanoparticules

Pour cibler un CHC, la doxorubicine a été attachée à des magnétosomes de bactéries composés d'oxyde de fer ($\varnothing = 35 \text{ nm}$) [217-219]. Le système magnétosomes-doxorubicine a libéré progressivement l'agent anticancéreux. Cependant, ce vecteur n'a pas encore été évalué ni *in vitro* pour le ciblage avec un aimant permanent ni *in vivo* pour le traitement du CHC. Un autre vecteur était composé de 'poly(ethylene oxide)-trimellitic anhydride chloride-folate' (PEO-TMA-FA), de DOX et de nanoparticules Fe_3O_4 . Ce vecteur a permis de cibler une tumeur du foie implantée chez le lapin et le rat grâce au folate, d'inhiber la croissance tumorale, de réduire les effets secondaires de la DOX et de localiser le vecteur par IRM [141]. Enfin, pour la radio-immunothérapie, l'isotope ^{131}I a été conjugué à un anticorps anti VEGF (Sc-7269) puis fixé à des nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 recouvertes de dextran [29]. Cette formulation a été évaluée sur des souris avec une tumeur du foie sous-cutanée. Pour augmenter le ciblage, un aimant avec une densité de flux de 0,6 T a été positionné à la surface de la tumeur pendant 48 heures après l'injection. Après une administration i.v, à 48 heures, 90 % de la dose injectée s'est retrouvé au niveau de la tumeur. Ainsi, avec ce double ciblage de la tumeur (magnétique et biologique), la quantité de nanoparticules se déposant dans les autres organes demeurait faible.

1.6.2.2 Hyperthermie

1.6.2.2.1 Microparticules

L'embolisation artérielle suivie par une hyperthermie a été réalisée chez le lapin avec des nanoparticules Fe_2O_3 ($\varnothing = 100\text{-}200\text{ nm}$) recouvertes d'un polyester formant des microparticules ($\varnothing = 32\text{ }\mu\text{m}$) avec une concentration de 62,5 % d'oxyde de fer (*m/m*) [164]. Après 14 jours, l'hyperthermie avec ces microparticules a diminué le volume de la tumeur de 50 à 90 % [163, 165, 166]. Avec ces microparticules, l'embolisation n'a pas affecté la croissance des cellules tumorales. Par conséquent, l'embolisation, en diminuant le flot sanguin dans la tumeur, a permis que le chauffage soit plus efficace [159, 160]. Cette hyperthermie a été comparée à celle effectuée avec des nanoparticules d'oxyde de fer injectées directement au niveau de la tumeur [164]. Avec les nanoparticules, la viabilité cellulaire n'a pas été affectée par l'hyperthermie; seulement quelques zones ont été nécrosées. Les auteurs ont supposé que la distribution des nanoparticules n'était pas homogène et que le refroidissement, causé par la circulation sanguine, a fortement restreint l'augmentation de la température dans la zone tumorale. Une autre étude a confirmé que l'hyperthermie couplée avec l'embolisation avec des microparticules d'albumine bovine ($\varnothing = 6\text{ }\mu\text{m}$) incorporant un complexe de magnétite-dextran (chargement de 40% (*m/m*)) permettait de réduire la croissance tumorale chez le rat [159]. Un groupe au Japon a aussi étudié l'effet de la composition des microparticules sur l'hyperthermie. Des microparticules ($\varnothing = 20\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$, $M_s = 92\text{ emu g}^{-1}$), faites de cristaux de Fe_3O_4 ($1\text{ }\mu\text{m}$), généraient une chaleur de 10 W g^{-1} (300 Oe, 100 kHz) par dissipation de l'énergie du cycle d'hystérésis [97]. En utilisant des cristaux de Fe_3O_4 de 50 nm dans les microparticules ($M_s = 53\text{ emu g}^{-1}$), la chaleur générée par un mécanisme de relaxation est passée à 41 W g^{-1} . L'optimisation des microparticules a permis d'atteindre une chaleur de 45 W g^{-1} [95, 96, 123]. Néanmoins, aucune étude ne rapporte leur efficacité *in vivo*.

1.6.2.2.2 Nanoparticules

L'hyperthermie avec des nanoparticules d'oxyde de fer ($\varnothing = 100\text{-}200\text{ nm}$) suspendues dans du lipiodol a été évaluée dans une tumeur VX2 implantée chez le lapin [165]. Pour atteindre

une température de 42 °C dans la tumeur, une dose de 75 mg a dû être injectée. Cependant, plus la dose de nanoparticules augmentait, plus la concentration en nanoparticules dans le tissu sain augmentait. Ceci entraîna une augmentation de la température dans le foie sain lors de l'hyperthermie. Une étude japonaise a montré que la génération de chaleur était meilleure avec des nanoparticules ($\varnothing = 7$ nm) qu'avec des microparticules ($\varnothing = 40$ μ m) [160]. L'hyperthermie par les mécanismes de relaxation de Néel et de Brown était plus efficace que celle par perte au niveau du cycle d'hystérésis.

Une autre utilisation de l'hyperthermie vise à contrôler ou activer la libération d'un agent anticancéreux. Une équipe a utilisé des nanoparticules de chitosan ($\varnothing = 207 \pm 21$ nm) chargées avec des nanoparticules de fer recouvertes de carbone et de carboplatine comme agent anticancéreux ($11,0 \pm 1,1$ % (m/m)) [121]. Ce vecteur a libéré le carboplatine sur plusieurs jours. L'hyperthermie a accéléré la cinétique de libération. Pour le ciblage de la tumeur du foie chez le rat, un aimant générant un champ magnétique de 5000 G a été placé au dessus de l'organe pendant 30 min en ouvrant l'abdomen. Les nanoparticules ont permis d'atteindre une température de 42 °C dans la tumeur (180 kHz, 30 min). Le ciblage magnétique combiné avec l'hyperthermie a réduit de 93 % la croissance de la tumeur et augmenté le taux de survie de 60 % après 60 jours. Cependant, malgré l'aimant, une grande quantité de nanoparticules s'est retrouvée dans le lobe sans tumeur et la température a atteint 40 °C. Un autre vecteur ($\varnothing = 50$ nm, $M_s = 51$ emu g⁻¹) constitué de nanoparticules d'oxyde de fer Fe₂O₃ et de la DOX recouvertes par un polymère thermosensible (poly(*N*-isopropylacrylamide, PNIPAM)) a été évalué [185]. L'hyperthermie a augmenté la vitesse de libération de DOX (2,5 % (m/m)). Le ciblage d'un CHC a été réalisé en plaçant un aimant de 0,8 T pendant 30 min au dessus du foie d'une souris. Pour autant, l'étude ne présentait aucun dosage des nanoparticules dans la tumeur et les autres organes, seulement des données qualitatives par IRM et histologie montrant la présence des nanoparticules. Une publication récente a montré que le chargement en doxorubicine pouvait augmenter jusqu'à 4 % (m/m) [186].

Cette revue de littérature a mis en évidence la difficulté de traiter le CHC à cause de son caractère hétérogène. En raison de sa fréquence croissante, de nombreuses recherches sont en

cours afin d'améliorer les traitements et d'en développer de nouveaux plus efficaces et plus ciblés. La thérapie moléculaire est l'une des approches les plus nouvelles et dont les premiers résultats sont encourageants. Cependant, les effets secondaires causés par la circulation systémique de ces agents spécifiques sont importants et limitent ainsi les doses injectées. Par conséquent, son impact sur le taux de survie reste limité à quelques mois. La chimio-embolisation est le traitement palliatif le plus utilisé. Cette technique est aussi très employée en combinaison avec d'autres traitements. Cependant, le manque de ciblage de cette approche restreint son utilisation à des tumeurs bien vascularisées où il est possible de positionner le cathéter près de la tumeur. Malgré les progrès obtenus avec les microparticules à élution d'un agent anticancéreux, le pronostic à long terme reste pessimiste en raison du taux élevé de récurrence [116].

Tableau 1. 8: Traitement du CHC avec des vecteurs magnétiques dans des modèles animaux (NI = non indiqué)

Vecteur	Composition	Diamètre	Ciblage	Résultats	Ref
nanoparticules	$\text{Fe}_3\text{O}_4 + {}^{131}\text{I} + \text{Sc-7269}$	NI	aimant sur la peau (48 h)	inhibition de la croissance tumorale	[29]
nanoparticules	Fe-C + carboplatine + chitosan	207 nm	aimant sur le foie (ouverture de la cage thoracique, 30 min)	réduction de la croissance tumorale par hyperthermie + ciblage magnétique	[121]
microparticules	Fe-DOX Fe- ${}^{90}\text{Y}$	$0,5 < \varnothing < 5 \mu\text{m}$	aimant sur la peau (40 min)	nécrose de la tumeur, distribution des particules dans les zones saines	[64] [102]
microparticules	nanoparticules Fe_2O_3 + polyester	32 μm	aucun	diminution de la taille de la tumeur avec l'embolisation + hyperthermie	[165]

Le ciblage magnétique (Tableau 1. 8) constitue une voie intéressante pour améliorer les différents traitements du CHC. Cependant, la première expérience à l'échelle humaine avec un aimant externe fut difficile à réaliser et n'a pas donné de résultats satisfaisants. Les différents projets de recherche dans ce domaine se limitent à des tumeurs soit sous-cutanées ou alors implantées dans de petits modèles d'animaux afin que l'aimant soit très près de la zone ciblée. La diminution du champ magnétique avec la distance entre sa source et la cible constitue un

problème pour le transfert de cette technologie en clinique. Le développement des TMMC constitue donc une nouvelle approche pour le ciblage magnétique du CHC. Le ciblage par la MRN pourrait être aussi combiné avec d'autres traitements comme l'ablation thermique, la radioembolisation ou l'hyperthermie. Enfin, l'utilisation de l'IRM pour le guidage des microparticules est une avenue prometteuse, car il permet aussi de réaliser le diagnostic et le suivi du CHC (Tableau 1. 9). Ce système d'imagerie est préféré, car il minimise l'irradiation des patients. Il permet aussi de suivre l'accumulation en temps réel dans le foie de microparticules magnétiques. Cependant, les paramètres d'imagerie spécifiques aux TMMC devront être déterminés.

Tableau 1. 9: Détection en IRM des vecteurs magnétiques dans le foie (NI = non indiqué)

Vecteur	Composition	Diamètre	Localisation	Signal	Application	Ref
nanoparticules	$\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{Fe}_3\text{O}_4$ (Resovist [®])	57 nm	cellules de Kupffer	T2/T2*	détection des lésions	[221]
nanoparticules	SPIO + anticorps SM5-1	25 nm	cellules du CHC	T2	diagnostic du CHC	[105]
nanoparticules	SPIO + PLGA + TPGS	300 nm	NI	T2	clairance de l'effet en imagerie en 24 h	[184]
microparticules	cristaux Fe_3O_4 + microparticules de verre	$20 < \varnothing < 40 \mu\text{m}$	vaisseaux tumoraux	T2*	suivi en temps réel de l'accumulation des particules	[70]
microparticules	SPIO + Emboshperes [®]	$100 < \varnothing < 300 \mu\text{m}$ $300 < \varnothing < 500 \mu\text{m}$	vaisseaux tumoraux	T2*	accumulation distale des petites particules	[112]

CHAPITRE 2 DÉMARCHE SCIENTIFIQUE DES ARTICLES

Les résultats de recherche sont présentés sous forme d'articles, car tous les objectifs ont été traités dans ces deux publications. Le chapitre 3 est constitué de l'article publié dans le journal 'Biomaterials' (soumis le 23/07/2009, accepté le 2/08/2009) sous le titre 'Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization' (nanoparticules magnétiques encapsulées dans des microparticules biodégradables guidées avec un système d'imagerie par résonance magnétique pour la chimio-embolisation des tumeurs). Ce premier article introduisit le concept de la MRN des microparticules magnétiques embolisantes vers la zone cancéreuse. Il présenta: l'étude de conception selon les contraintes de la chimio-embolisation et celles de la MRN au niveau de l'artère hépatique, puis la validation expérimentale de cette conception par l'encapsulation de nanoparticules fer-cobalt (FeCo) dans des microparticules biodégradables en PLGA et son guidage *in vitro*. Les nanoparticules FeCo ont été choisies en raison de leur très grande Ms, plus du double de celle des nanoparticules d'oxyde de fer. Le PLGA a été choisi, car il est biodégradable, biocompatible et soluble dans le dichlorométhane, le même solvant organique utilisé pour suspendre les nanoparticules FeCo. Cet article présenta plusieurs méthodes: (i) la modélisation mathématique du guidage des TMMC selon leurs propriétés (diamètre, chargement et type de nanoparticules), (ii) la méthode de synthèse par voie chimique et le recuit des nanoparticules FeCo, (iii) l'encapsulation par émulsion des nanoparticules, (iv) la caractérisation des nanoparticules et microparticules (courbe de magnétisation mesurée avec un magnétomètre à échantillon vibrant, imagerie par microscopie électronique à balayage et en transmission, analyse de la distribution de taille par microscopie optique, diffraction des rayons X, analyse chimique par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)), (v) le montage de guidage *in vitro* représentant l'artère hépatique du lapin et sa bifurcation gauche/droite et les techniques développées pour évaluer l'efficacité de guidage (analyse des vidéos des essais de guidage et dosage du fer et du cobalt par SAA). Cet article a confirmé la faisabilité du projet.

Le deuxième article a été publié dans le journal 'Biomaterials' (soumis le 10/12/2010, accepté le 31/12/2010) sous le titre 'Co-encapsulation of magnetic nanoparticles and doxorubicin

into biodegradable microcarriers for deep tissue targeting by vascular MRI navigation' (Co-encapsulation de nanoparticules magnétiques et de doxorubicine dans des microparticules biodégradables pour le ciblage des tissus profonds par la navigation IRM vasculaire). Ce travail était la suite directe du premier article. Il comprenait: la co-encapsulation des nanoparticules FeCo avec la doxorubicine comme agent anticancéreux, la caractérisation des TMMC, les essais de guidage *in vitro* dans des conditions physiologiques et de radiologie interventionnelle (vitesse d'écoulement, gradient magnétique, distance entre le cathéter et la bifurcation), et le guidage *in vivo* dans l'artère hépatique d'un lapin pour cibler le lobe droit ou gauche du foie. La doxorubicine a été choisie, car c'est un agent anticancéreux très utilisé pour le traitement du CHC. Cet article présente plusieurs nouvelles méthodes: (i) la co-encapsulation par émulsion de la DOX avec les nanoparticules FeCo, (ii) la caractérisation de la DOX dans les TMMC par fluorescence (chargement et libération), (iii) le montage de guidage *in vitro* et l'évaluation de l'efficacité de guidage par le dosage de la DOX, (iv) le développement du protocole de radiologie interventionnelle pour la MRN (placement des cathéters, contrôle du débit sanguin dans l'artère hépatique et optimisation des séquences d'IRM), (v) les techniques développées pour évaluer la distribution des TMMC dans les lobes du foie (analyse histologique, dosage de la DOX et du cobalt), et (vi) le dosage de la DOX dans le plasma. Les résultats présentés dans le deuxième article correspondent aux objectifs 2 et 3 accomplis.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1: MAGNETIC NANOPARTICLES ENCAPSULATED INTO BIODEGRADABLE MICROPARTICLES STEERED WITH AN UPGRADED MAGNETIC RESONANCE IMAGING SYSTEM FOR TUMOR CHEMOEMBOLIZATION

Pierre Pouponneau, Jean-Christophe Leroux, and Sylvain Martel*

3.1 Abstract

In this work, therapeutic magnetic micro carriers (TMMC) guided in real time by a magnetic resonance imaging (MRI) system are proposed as a means to improve drug delivery to tumor sites. MRI steering constraints and physiological parameters for the chemoembolization of liver tumors were taken into account to design magnetic iron-cobalt nanoparticles encapsulated into biodegradable poly(D,L-lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) microparticles with the appropriate saturation magnetization (M_s). FeCo nanoparticles displayed a diameter of 182 nm and an M_s of 209 emu g⁻¹. They were coated with a multilayered graphite shell to minimize the reduction of M_s during the encapsulation steps. FeCo-PLGA microparticles, with a mean diameter of 58 μ m and an M_s of 61 emu g⁻¹, were steered in a phantom mimicking the hepatic artery and its bifurcation, with a flow in the same order of magnitude as that of the hepatic artery flow. The steering efficiency, defined as the amount of FeCo-PLGA microparticles in the targeted bifurcation channel divided by the total amount of FeCo-PLGA microparticles injected, reached 86%. The data presented in this paper confirms the feasibility of the steering of these TMMC.

Keywords: magnetism; nanoparticle; microencapsulation; MRI (magnetic resonance imaging); embolization.

3.2 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most frequent primary liver cancer, remains the third cause of cancer-related death [1-3]. The survival rate for 70% of HCC patients relies on the efficacy of palliative treatments [1,2,4]. Trans arterial chemoembolization (TACE), consisting of the injection of chemotherapeutic drugs followed by obstruction of the feeding hepatic arteries supplying the tumor with an embolizing agent, is considered as the mainstay of palliative treatment for unresectable HCC [4-6]. Despite an increase in patients' survival rate, TACE efficacy is limited by the lack of tumor targeting resulting in four main drawbacks: i) a fraction of the injected dose reaches the systemic circulation inducing unwanted cytotoxic effects [7]; ii) the antitumor drug attacks healthy liver cells [4,8]; iii) the procedure remains painful for the patient because healthy blood vessels are embolized [8]; iv) hepatic artery damages can occur during TACE, which can interfere with the catheterization at the next session and compromise the success of the treatment [9]. To minimize TACE drawbacks, we propose the development of therapeutic magnetic micro carriers (TMMC) based on magnetic nanoparticles, which could be steered in real time with an upgraded magnetic resonance imaging (MRI) system from the hepatic artery to HCC nodules and thus to produce a chemoembolization confined to the tumor area (Fig. 3.1a).

TMMC consist of biodegradable microparticles co-encapsulating an antitumor drug and magnetic nanoparticles required for the MRI steering and tracking (Fig. 3.1b). After the embolization of tumor blood vessels due to the size of TMMC, the drug will be released as the polymer degrades (Fig. 3.1a). Thus, the concentration of the drug in the systemic circulation should be reduced and the antitumor effect should be increased by the sustainable release of the drug over time [7,10]. For the steering in the blood vessels, an MRI system upgraded with custom gradient coils placed in its tunnel will be used. The permanent magnetic field of the MRI system saturates the magnetization of nanoparticles [11]. Gradient coils will generate the magnetic force required for the transversal displacement of TMMC in the blood flow to reach the targeted blood vessel (Fig. 3.1a) and the MRI system will track the position of TMMC.

Compared to traditional magnetic drug targeting that uses external magnets to trap magnetic particles and are therefore generally limited to tissues close to the skin [12-16], our technology would control the distribution of TMMC in deep tissues [11,17]. Accordingly, most of TMMC injected could be steered to the tumor area.

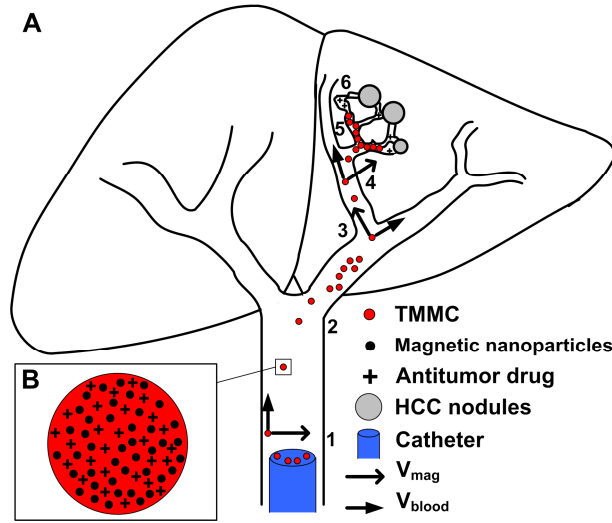


Figure 3. 1: Schematic representation of the steering of therapeutic magnetic micro carriers (TMMC) for liver chemoembolization: A) Magnetic gradient-controlled steering of TMMC reaching HCC nodules. 1) Release of TMMC from the catheter, 2) Steering of TMMC in the hepatic artery, 3) Steering of TMMC in the left hepatic artery, 4) Steering of TMMC to the tumor blood vessel, 5) Tumor embolization and 6) Drug release. B) Structure of TMMC.

This paper introduces the design of TMMC according to MRI steering constraints and physiological parameters. To establish the proof of concept, biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles loaded with iron-cobalt nanoparticles were successfully steered in a phantom mimicking the hepatic artery (Fig. 3S.1 in the supplementary data).

In this work, the system was designed using physiological parameters of rabbits. This animal model is routinely employed for the assessment of liver tumor treatments [18]. For the embolization of the rabbit liver, 40 μm was reported as the minimum average microparticle diameter [19]. For the MRI steering in the hepatic artery (Fig. 3.1a), we defined the blood velocity (V_{blood}) as the longitudinal velocity acquired by TMMC dragged by the rabbit hepatic

artery blood flow (37 mL min^{-1}) [20], and the magnetophoretic velocity (V_{mag}) as the transversal velocity acquired by TMMC under the magnetic gradient in the MRI system [15]. V_{mag} (m s^{-1}) was calculated according to Equation 1:

$$V_{mag} = \frac{f \times Ms_{nanoparticles} \times \rho \times V_{TMMC} \times \nabla B}{6\pi \times a \times \mu} \quad (1)$$

Where,

f is the concentration of encapsulated magnetic nanoparticles (% w/w), $Ms_{nanoparticles}$ is the nanoparticle saturation magnetization (emu g^{-1}) (emu: electromagnetic units), ρ is the nanoparticle density (kg m^{-3}), V_{TMMC} is TMMC volume (m^3), ∇B is the applied magnetic steering gradient (T m^{-1}), a is the TMMC radius (m) and μ is the blood viscosity (0.0035 Pa s).

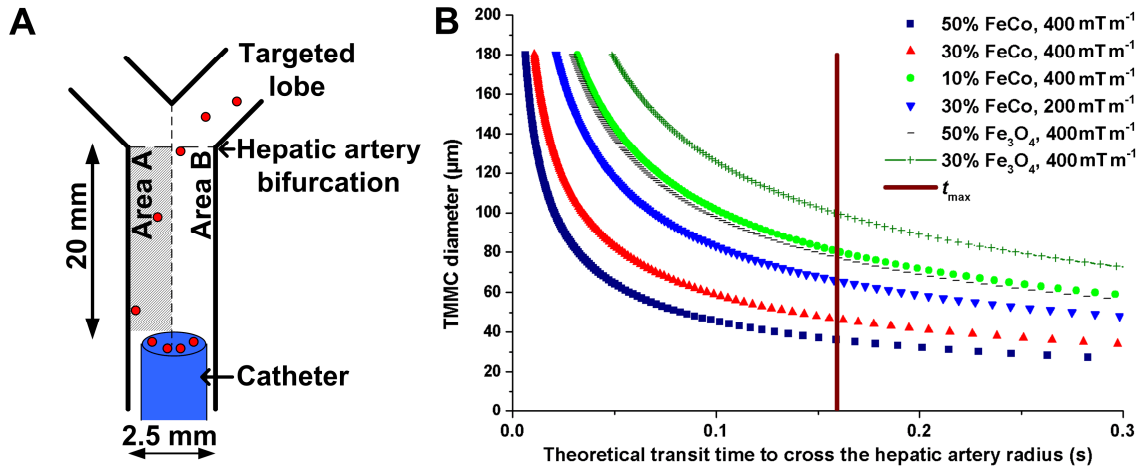


Figure 3. 2: Design of TMMC for the MRI steering in the hepatic artery of the rabbit: A) Schematic view of the TMMC steering in the rabbit hepatic artery. To reach the targeted lobe, TMMC should end up in area B. The transit time of TMMC to cross the hepatic artery radius should be less than the time required by TMMC dragged by the blood flow to reach the bifurcation (t_{max}) B) Comparison of t_{max} to the theoretical transit time of TMMC required to cross the hepatic radius: influence of composition of encapsulated nanoparticles, nanoparticle loading, TMMC diameter and applied magnetic gradient. For a TMMC diameter of $83 \mu\text{m}$, the loading of FeCo nanoparticles is 10% and the loading of Fe_3O_4 nanoparticles is 50%. With a loading 30% of FeCo nanoparticles, TMMC diameter decreases from $70 \mu\text{m}$ to $50 \mu\text{m}$ when the magnetic gradient increases from 200 mT m^{-1} to 400 mT m^{-1} .

For steering, the hepatic artery was virtually delimited in two areas referred to as areas A and B (Fig. 2a). In order to bring the TMMC *via* the blood flow into the targeted lobe, the TMMC should be in area B at the hepatic artery bifurcation [15]. TMMC, which are in area A, are directed to the targeted lobe by crossing the artery radius (1.25 mm) (Fig. 3.2a). Accordingly, from V_{mag} , we determined the time required by TMMC to cross the artery radius, referred to as the transit time. We hypothesized that the catheter would be placed at 20 mm from the bifurcation (Fig. 3.2a), and from V_{blood} , we calculated the time required by TMMC dragged by the blood flow to reach the bifurcation (t_{max}). To reach the targeted lobe, the transit time should be lower than t_{max} . Fig. 3.2b compares t_{max} to the theoretical transit time calculated for different properties of TMMC – *i.e.* - TMMC diameter, composition (FeCo *vs.* Fe_3O_4), loading of magnetic nanoparticles and applied magnetic gradient. It can be seen that compared to Fe_3O_4 nanoparticles ($Ms = 90 \text{ emu g}^{-1}$) which are used in biomedical applications [13,21,22], FeCo nanoparticles ($Ms = 230 \text{ emu g}^{-1}$) allow to decrease the loading of nanoparticles in TMMC and decrease the TMMC diameter for a same loading level (Fig. 3.2b) [21,23]. These simulations suggest that under a magnetic gradient of 400 mT m^{-1} , embolization in the targeted hepatic lobe is possible for TMMC bearing 30% FeCo nanoparticles and exhibiting a diameter of $50 \mu\text{m}$.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Materials

$Fe(CO)_5$, oleic acid, tris-*n*-octyl-phosphine oxide, PLGA ($M_w = 50,000\text{-}70,000$; L/G molar ratio = 50/50), and poly(vinyl alcohol) (PVA, 88% hydrolyzed, $M_w = 13,000\text{-}23,000$) were purchased from Sigma Aldrich (ON, Canada). $Co_2(CO)_8$ and anhydrous dichlorobenzene (DCB) were purchased from Fisher ThermoScientific (ON, Canada). All chemicals and solvents were used without further purification.

3.3.2 FeCo nanoparticle synthesis

$\text{Co}_2(\text{CO})_8$ (1 g) and $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (1.2 mL) in DCB (12 mL) were canulated into a solution of oleic acid (1.8 mL) and tris-*n*-octyl-phosphine oxide (0.4 g) in DCB (48 mL) at 200°C under reflux and inert atmosphere. After 35 min at 285°C, the suspension was cooled down to room temperature and passed through a 0.2- μm filter (Sigma Aldrich). FeCo nanoparticles were washed three times by centrifugation (45,000 g, 20 min) with ethanol. FeCo nanoparticles were transferred to a crucible and placed in an oven (Lindberg, MI, USA) under argon atmosphere. The annealing cycle was the following: 20 to 350°C at the rate of 11°C/min maintained for 10 min, 350 to 650°C at the rate of 6.5°C/min maintained for 30 min, 650 to 250°C at the rate of 1.5°C/min. Annealed FeCo nanoparticles were suspended in a solution of oleic acid (7.5 mL) in dichloromethane (DCM) (15 mL). Nanoparticles were sonicated during 6 min at 60 W in pulse mode (Sonic Dismembrator 550, Fisher ThermoScientific) and homogenized with a PowerGen 700D (Fisher ThermoScientific) at 10,000 rpm for 2 min. The sonication and homogeneization steps were repeated five times. FeCo nanoparticles were washed three times by centrifugation (15,000 g, 15 min).

3.3.3 Encapsulation of FeCo nanoparticles into PLGA microparticles

PLGA (0.37 g) was added to FeCo nanoparticles (0.13 g) in DCM (1 mL). FeCo nanoparticles and PLGA were emulsified (5000 rpm, 5 min) (PowerGen 700D) with an aqueous solution of 0.3% (w/v) PVA (1.5 mL). At the end of the emulsion step, 0.3% PVA solution (8 mL) was added to the dispersion. DCM was evaporated under rotation in vacuum for 50 min. FeCo-PLGA microparticles were washed three times by centrifugation (1000 g, 5 min). FeCo-PLGA microparticles were collected on a 20- μm filter. Microparticles were freeze-dried (Freeze Dry system, MI, USA) and stored at -20°C until use.

3.3.4 FeCo nanoparticle and FeCo-PLGA microparticle characterization

Before the annealing step, the nanoparticle size in DCM was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano Series, Malvern Instrument, U.K.). After the annealing, nanoparticles

were imaged by transmission electron microscopy (TEM) (Jeol 2100F, Japan), and the chemical analysis was determined by energy dispersive spectrometry (EDS) (Inca, Oxford Instrument, MA, USA) and atomic absorption spectrometry (AAS) (S Series AAS, Fisher ThermoScientific). AAS was calibrated with Fe and Co standards (Sigma Aldrich). FeCo-PLGA microparticle size distribution was measured by image analysis of data obtained by optical microscopy (Imager Z1, Carl Zeiss GmbH, Germany). FeCo-PLGA microparticles were cut with a focused ion beam (FB-2000A, Hitachi, CA, USA) and the cross-section was imaged by field emission gun scanning electron microscopy (SEM) (Jeol JSM-7600TFE). Magnetic properties of FeCo nanoparticles and FeCo-PLGA microparticles were measured with a vibrating sample magnetometer (VSM) (Walker Scientific, MI, USA) at room temperature. The loading of FeCo nanoparticles was determined by dividing M_s of FeCo-PLGA microparticles by M_s of FeCo nanoparticles before encapsulation. The loading was determined by AAS after degradation of FeCo-PLGA microparticles in a solution of HNO_3 (63 M) and HCl (36 M) at 110°C under reflux.

3.3.5 MRI magnetic steering

The MRI steering setup is composed of a 1.5 T Siemens Avento clinical MRI scanner (Siemens, Germany), an MRI compatible camera (MRC systems GmbH, Germany) directly above the bifurcation of the phantom, home-made steering gradient coils [11], two syringe pumps (New Era Pump System, Inc., NY, USA), and a Plexiglas hepatic artery phantom with a rectangular cross section (width = 2.5 mm and depth = 300 μm) (Fig. 3S.1). The depth of the channel was chosen according to the depth of focus of the camera placed above the bifurcation. An aqueous solution of 3% (w/v) bovine serum albumin with a viscosity of 0.0015 Pa s (DV-II+ Viscometer, Brookfield, MA, USA) was used. In the phantom, the flow was set at 8 mL/min (instead of 8.8 mL/min which is the rabbit hepatic artery flow in the phantom) (Fig. S1) [20]. At higher flow, FeCo-PLGA microparticles were not clearly detected by the video camera. The magnetic gradients were $\pm 400 \text{ mT m}^{-1}$ to target each channel outlet (left or right).

The steering efficiency was determined by AAS and video analysis. FeCo-PLGA microparticles collected during each steering assay were degraded in a solution of HNO_3 (63 M)

and HCl (36 M). Iron and cobalt concentrations in each vial were quantified by AAS. The steering efficiency was determined by the ratio of the concentration of metallic ions collected in the vial placed at the outlet of the targeted channel divided by the sum of metallic ions collected in the two vials. For the video analysis, the background of each image extracted from steering videos was erased with a MatLab function (The Mathworks, MA, USA). The surface of each aggregate was measured with Zeiss Axiovision software (Carl Zeiss GmbH, Germany). The steering efficiency was determined by the sum of aggregate surfaces in the targeted channel divided by the sum of aggregate surfaces in each channel. The steering results were compared with the Kruskal-Wallis test at 5% confidence level.

3.4 Results and discussion

3.4.1 *FeCo nanoparticles*

FeCo nanoparticles ($d = 15 \pm 8$ nm) were synthesized as described previously [21], and then annealed under inert atmosphere at 650°C to improve their magnetic properties [24-26]. TEM images show that the mean diameter of annealed FeCo nanoparticles increased to 182 ± 81 nm (Fig. 3.3a) with a broad size distribution. This could be explained by the aggregation of nanoparticles probably occurring upon the degradation of surfactant during the annealing process. These nanoparticles were coated with a multilayered graphite shell (Fig. 3.3a and b), with thickness of 8 ± 4 nm and interlayer spacing of 0.34 nm, corresponding to graphite planes [24,26-28]. The atomic ratio (%) Fe:Co in the nanoparticles, determined by EDS and AAS, was 56:44. The saturation magnetization reached 209 ± 1.4 emu g^{-1} (Fig. 3.4), in agreement with literature [25,28]. M_s remained stable for 7 days, possibly due to the graphite shell which slowed down the oxidation of nanoparticles [26]. Figure 3.4 shows that annealed FeCo nanoparticles displayed ferromagnetic behavior because the diameter of nanoparticles allowed the presence of several magnetic domains.

After several sonication and homogenization steps required to suspend FeCo nanoparticles in DCM for their encapsulation into the PLGA microparticles, M_s decreased by 10% ($187 \pm 6.4 \text{ emu g}^{-1}$) (Fig. 3.4). However, it remained twice as high as that of Fe_3O_4 nanoparticles. TEM observation (data not shown) suggested that this slight decrease in magnetization was the consequence of the oxidation of some nanoparticles occurring during these steps because some graphite shells were broken.

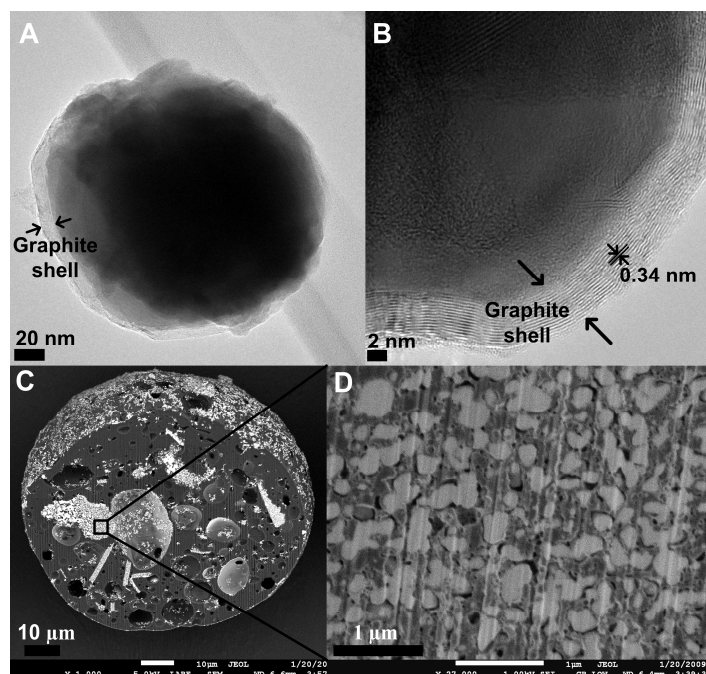


Figure 3. 3: A) TEM image of FeCo nanoparticles after annealing (scale bar = 20 nm). B) TEM image of the graphite shell of FeCo nanoparticles (scale bar = 2 nm). C) SEM image of the cross-section of FeCo-PLGA microparticle (scale bar = 10 μm). D) FeCo nanoparticle distribution in the PLGA microparticle (scale bar = 1 μm). In Figs 3c and d, FeCo nanoparticles are white, PLGA are grey and pores are black.

3.4.2 FeCo-PLGA microparticles

Fig. 3.3c shows that FeCo nanoparticles were encapsulated into PLGA microparticles with an average diameter of $58 \pm 17 \text{ μm}$ (Fig. 3S.2), which fits the size requirement for embolization [19]. According to a cross-section SEM image (Fig. 3.3c), FeCo-PLGA microparticles were homogeneously coated with nanoparticles, whereas the matrix exhibited clusters of closely compacted nanoparticles (Fig. 3.3d). The loading capacity was estimated at

33% by VSM and at 40% (w/w) by AAS [29]. This small difference was attributed to the slight decrease of M_s of FeCo nanoparticles because of minor damage to the graphite shell during the encapsulation process. However, the graphite shell prevented a strong decrease of the magnetization due to the sensitivity of FeCo nanoparticles to oxidation during the encapsulation process [24,25,30]. Fig. 3.4 shows that FeCo-PLGA microparticles displayed a ferromagnetic behavior with an M_s of $61 \pm 2.5 \text{ emu g}^{-1}$. To the best of our knowledge, these microparticles exhibited the highest M_s value reported in the literature for magnetic nanoparticles encapsulated into PLGA microparticles [31-34]. The size and the saturation magnetization of FeCo-PLGA microparticles met the steering requirements (Fig. 3.2b).

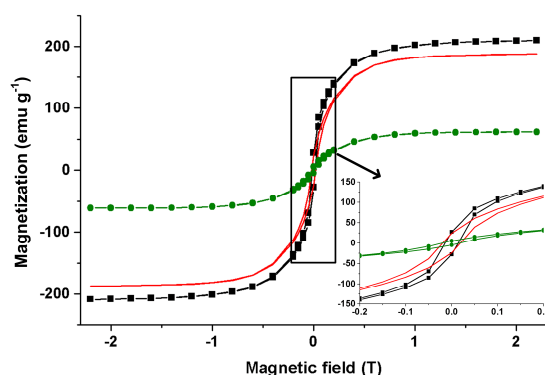


Figure 3. 4: Hysteresis loops recorded at 20°C of —■— FeCo nanoparticles after annealing ($M_s = 209 \pm 1.4 \text{ emu g}^{-1}$), — FeCo nanoparticles before the encapsulation ($M_s = 187 \pm 6.4 \text{ emu g}^{-1}$), and —●— FeCo-PLGA microparticles ($M_s = 61 \pm 2.5 \text{ emu g}^{-1}$). Inset shows the hysteresis loop between 0 to 0.2T.

3.4.3 FeCo-PLGA microparticle MRI magnetic steering

The MRI steering ability of the synthesized microparticles was tested in a phantom mimicking the hepatic artery with a flow in the same order of magnitude as that of the hepatic artery flow (Fig. S1). In the MRI tunnel, FeCo-PLGA microparticles formed aggregates oriented in the direction of the magnetic field (Fig. 3.5a; Videos 1, 2, and 3 in the supplementary data) [35]. The steering efficiency, defined as the amount of FeCo-PLGA microparticles in the targeted channel divided by the total amount of FeCo-PLGA microparticles in both channels, was determined by AAS and confirmed by video analysis. Fig. 3.5 shows that without magnetic gradients, FeCo-PLGA microparticles were equally distributed in both channels of the phantom

($49 \pm 5\%$) (Video 1). With a magnetic gradient of $\pm 400 \text{ mT m}^{-1}$, the steering efficiency reached $86 \pm 11\%$ (Fig. 3.5, Videos 2 and 3), which represented a significant targeting of the microparticles ($p < 0.05$). The theoretical steering efficiency calculated from V_{mag} reached 73%. As 27% of the volume of the suspension consisted of microparticles smaller than $40 \mu\text{m}$, the smallest FeCo-PLGA microparticles could not reach area B before the bifurcation (Fig. 3.2a). The experimental steering efficiency was found to be greater than the theoretical one due to some magnetic aggregation of FeCo-PLGA microparticles, which increased the magnetic volume to steer [36], thereby reducing transit time (Fig. 3.2b).

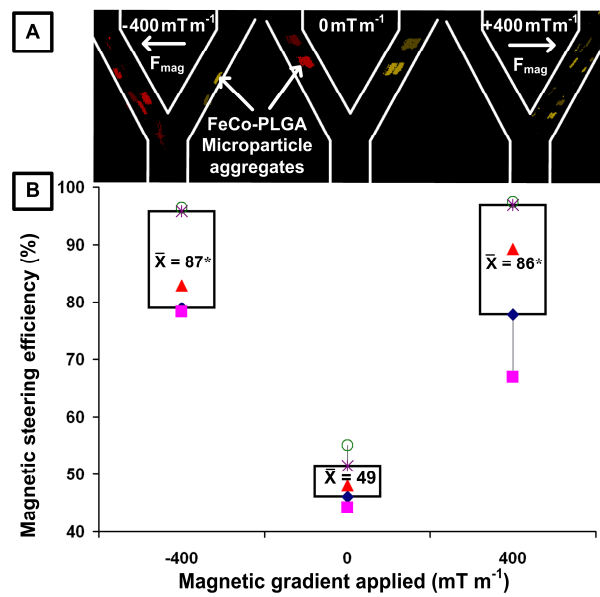


Figure 3. 5: FeCo-PLGA microparticles steering efficiency: A) Images of FeCo-PLGA microparticle aggregates in the phantom from steering videos after background subtraction. B) Box plots of the in vitro steering efficiency of FeCo-PLGA microparticles. \blacklozenge quartile Q1, \blacksquare minimum, \blacktriangle median, \bigcirc quartile Q2, \times maximum, $\ast p < 0.05$ compared to 0 mT m^{-1} (Kruskal-Wallis test) ($n=5$ for -400 mT m^{-1} ; $n=3$ for 0 mT m^{-1} , $n=9$ for 400 mT m^{-1}).

3.5 Conclusion

FeCo nanoparticles with very high saturation magnetization were successfully encapsulated into PLGA microparticles. The graphite shell surrounding FeCo nanoparticles minimized the M_s loss during the encapsulation process. FeCo-PLGA microparticles exhibited

high saturation magnetization required for the MRI magnetic steering and the appropriate mean diameter for the rabbit liver embolization. The magnetic steering assay results demonstrated that FeCo-PLGA microparticles could be steered in a channel mimicking the rabbit liver artery. Further work will aim at further optimizing the system in view of an *in vivo* application.

3.6 Acknowledgements

This project is supported by the Canada Research Chair program, the Canada Foundation for Innovation, the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), and the Government of Québec. The author acknowledges Jeanne Leblond (UDM) for her collaboration in the synthesis of FeCo nanoparticles, Genevieve Gaucher (UDM) for her advices regarding the preparation of PLGA microparticles, Sylvie Marceau and Amira Khoury (UDM) for the access to AAS, Pr. David Menard (EPM) for the access to the VSM, Carole Massicotte (EPM) for the access to the oven, Jean-Baptiste Mathieu (EPM) for his help for steering assays, Charles Tremblay (EPM) for his collaboration in the realization of the phantom, Jean-Philippe Masse (EPM) for his collaboration with TEM analysis, Centre Hospitalier Universitaire de Montreal (CHUM) for the access to the MRI system.

Appendix:

Supplementary data such as figures of the MRI steering setup and FeCo-PLGA microparticle size distribution; videos of FeCo-PLGA microparticle flow with and without magnetic gradient in the MRI tunnel are provided in the on-line version.

3.7 References

1. Cabibbo G, Latteri F, Antonucci M, Craxi A. Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009; 6:159-69.

2. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42:1208-36.
3. Capocaccia R, Sant M, Berrino F, Simonetti A, Santi V, Trevisani F. Hepatocellular carcinoma: trends of incidence and survival in Europe and the United States at the end of the 20th century. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1661-70.
4. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT *et al.* Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35:1164-71.
5. Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J *et al.* Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359:1734-9.
6. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37:429-42.
7. Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46:474-81.
8. Wigmore SJ, Redhead DN, Thomson BN, Currie EJ, Parks RW, Madhavan KK *et al.* Postchemoembolisation syndrome--tumour necrosis or hepatocyte injury? *Br J Cancer* 2003; 89:1423-7.
9. Maeda N, Osuga K, Mikami K, Higashihara H, Onishi H, Nakaya Y *et al.* Angiographic evaluation of hepatic arterial damage after transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Radiat Med* 2008; 26:206-12.
10. Hong K, Khwaja A, Liapi E, Torbenson MS, Georgiades CS, Geschwind JF. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:2563-7.

11. Mathieu J-B, Martel S. Magnetic microparticle steering within the constraints of an MRI system: Proof of concept of a novel targeting approach. *Biomed Microdevices* 2007; 9:801-8.
12. Amirfazli A. Nanomedicine: magnetic nanoparticles hit the target. *Nat Nanotechnol* 2007; 2:467-8.
13. Duran JD, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J Pharm Sci* 2008; 97:2948-83.
14. Udrea LE, Strachan NJ, Badescu V, Rotariu O. An in vitro study of magnetic particle targeting in small blood vessels. *Phys Med Biol* 2006; 51:4869-81.
15. Grief AD, Richardson G. Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery. *J Magn Magn Mater* 2005; 293:455-63.
16. Rudge SR, Kurtz TL, Vessely CR, Catterall LG, Williamson DL. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomaterials* 2000; 21:1411-20.
17. Martel S, Mathieu J-B, Felfoul O, Chanu A, Aboussouan E, Tamaz S *et al.* Automatic navigation of an untethered device in the artery of a living animal using a conventional clinical magnetic resonance imaging system. *Appl Phys Lett* 2007; 90:114105-3.
18. Pauser S, Wagner S, Lippmann M, Pohlen U, Reszka R, Wolf KJ *et al.* Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: an experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver. *Cancer Res* 1996; 56:1863-7.
19. Bastian P, Bartkowski R, Kohler H, Kissel T. Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 46:243-54.
20. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* 1993; 10:1093-5.

21. Hutten A, Sudfeld D, Ennen I, Reiss G, Hachmann W, Heinzmann U *et al.* New magnetic nanoparticles for biotechnology. *J Biotechnol* 2004; 112:47-63.
22. Cheng FY, Su CH, Yang YS, Yeh CS, Tsai CY, Wu CL *et al.* Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26:729-38.
23. Reiss G, Hutten A. Magnetic nanoparticles: Applications beyond data storage. *Nat Mater* 2005; 4:725-6.
24. Chaubey GS, Barcena C, Poudyal N, Rong C, Gao J, Sun S *et al.* Synthesis and stabilization of FeCo nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2007; 129:7214-5.
25. Wang C, Peng S, Lacroix L-M, Sun S. Synthesis of high magnetic moment CoFe nanoparticles via interfacial diffusion in core/shell structured Co/Fe nanoparticles. *Nano Research* 2009; 2:380-5.
26. Seo WS, Lee JH, Sun X, Suzuki Y, Mann D, Liu Z *et al.* FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nat Mater* 2006; 5:971-6.
27. Caiulo N, Yu CH, Yu KMK, Lo CCH, Oduro W, Thiebaut B *et al.* Carbon-decorated FePt nanoparticles. *Adv Funct Mater* 2007; 17:1392-6.
28. Desvaux C, Amiens C, Fejes P, Renaud P, Respaud M, Lecante P *et al.* Multimillimetre-large superlattices of air-stable iron-cobalt nanoparticles. *Nat Mater* 2005; 4:750-3.
29. Deng Y, Deng C, Qi D, Liu C, Liu J, Zhang X *et al.* Synthesis of Core/Shell Colloidal Magnetic Zeolite Microspheres for the Immobilization of Trypsin. *Adv Mater* 2009; 21:1377-82.
30. Wassel RA, Grady B, Kopke RD, Dormer KJ. Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles. *Colloids Surf A* 2007; 292:125-30.

31. Lee S-J, Jeong J-R, Shin S-C, Kim J-C, Chang Y-H, Lee K-H *et al.* Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Colloids Surf A* 2005; 255:19-25.
32. Astete CE, Kumar CSSR, Sabliov CM. Size control of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique. *Colloids Surf A* 2007; 299:209-16.
33. Zhou S, Sun J, Sun L, Dai Y, Liu L, Li X *et al.* Preparation and characterization of interferon-loaded magnetic biodegradable microspheres. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 87:189-96.
34. Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Herve K, Cohen-Jonathan S, Munnier E *et al.* Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67:31-8.
35. Helgesen G, Skjeltorp AT, Mors PM, Botet R, Jullien R. Aggregation of magnetic Microspheres: Experiments and Simulations. *Phys Rev Lett* 1988; 61:1736.
36. Darton NJ, Sederman AJ, Ionescu A, Ducati C, Darton RC, Gladden LF *et al.* Manipulation and tracking of superparamagnetic nanoparticles using MRI. *Nanotechnology* 2008; 19:395102.

3.8 Supplementary information

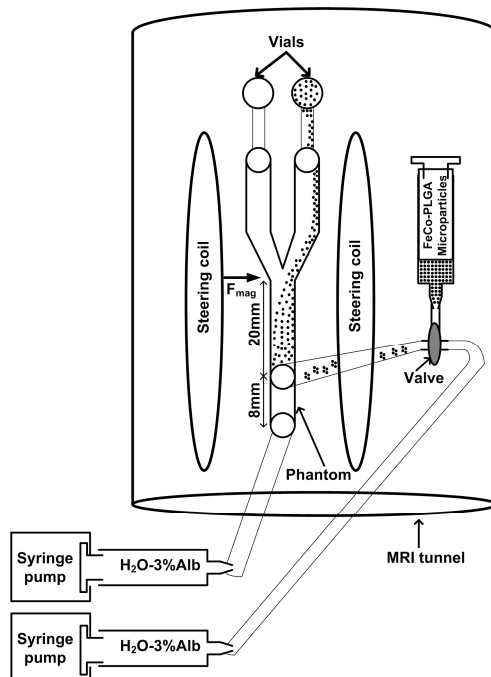


Figure 3S. 1: Schematic of the MRI steering setup (Alb = albumin).

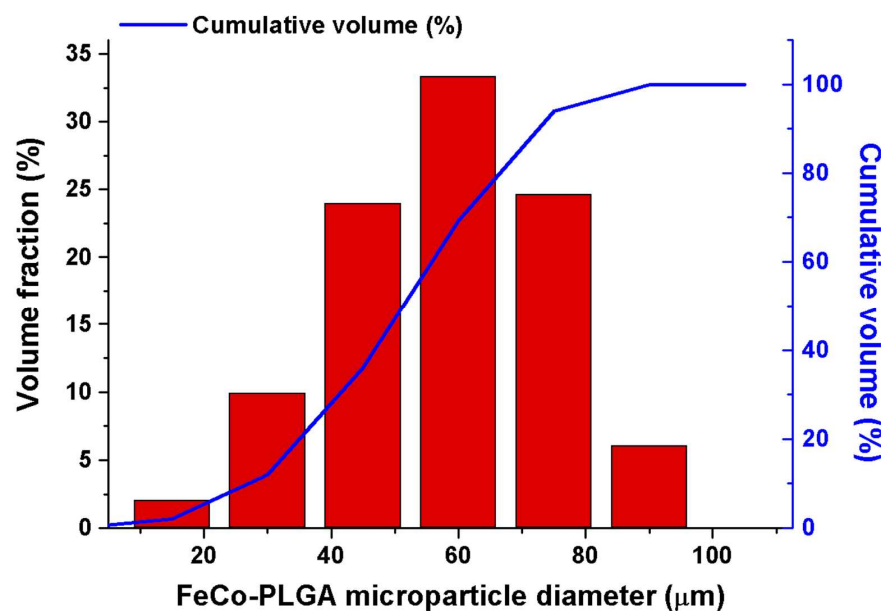


Figure 3S. 2: FeCo-PLGA microparticle size distribution (volume fraction and cumulative volume) determined by optical microscopy image analysis.

Video 1. FeCo-PLGA microparticle flow without magnetic gradient in the MRI tunnel.

doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.005

Video 2. FeCo-PLGA microparticle magnetic steering with -400 mT m^{-1} gradient (left channel (top) targeted after the bifurcation).

doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.005

Video 3. FeCo-PLGA microparticle magnetic steering with 400 mT m^{-1} gradient (right channel (bottom) targeted after the bifurcation).

doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.005

CHAPITRE 4 ARTICLE 2: COENCAPSULATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND DOXORUBICIN INTO BIODEGRADABLE MICROCARRIERS FOR DEEP TISSUE TARGETING BY VASCULAR MRI NAVIGATION

Pierre Pouponneau, Jean-Christophe Leroux, Gilles Soulez, Louis Gaboury, and Sylvain Martel*

4.1 Abstract

Magnetic tumor targeting with external magnets is a promising method to increase the delivery of cytotoxic agents to tumor cells while reducing side effects. However, this approach suffers from intrinsic limitations, such as the inability to target areas within deep tissues, due mainly to a strong decrease of the magnetic field magnitude away from the magnets. Magnetic resonance navigation (MRN) involving the endovascular steering of therapeutic magnetic microcarriers (TMMC) represents a clinically viable alternative to reach deep tissues. MRN is achieved with an upgraded magnetic resonance imaging (MRI) scanner. In this proof-of-concept preclinical study, the preparation and steering of TMMC which were designed by taking into consideration the constraints of MRN and liver chemoembolization are reported. TMMC were biodegradable microparticles loaded with iron-cobalt nanoparticles and doxorubicin (DOX). These particles displayed high saturation magnetization ($M_s = 72 \text{ emu g}^{-1}$), MRI tracking compatibility (strong contrast on T2*-weighted images), appropriate size for the blood vessel embolization ($\sim 50 \text{ }\mu\text{m}$), and sustained release of DOX (over several days). The TMMC were successfully steered *in vitro* and *in vivo* in the rabbit model. *In vivo* targeting of the right or left liver lobes was achieved by MRN through the hepatic artery located 4 cm beneath the skin. Parameters such as flow velocity, TMMC release site in the artery, magnetic gradient and TMMC properties, affected the steering efficiency. These data illustrate the potential of MRN to improve drug targeting in deep tissues.

Keywords: magnetism; nanoparticle; microencapsulation; MRI (magnetic resonance imaging); drug delivery; liver.

4.2 Introduction

Magnetic targeting was proposed 30 years ago as a means to increase cytotoxic agent concentration in tumors [1-4]. This approach consists in applying an external magnetic field to trap drug-loaded carriers in a targeted site [5]. Magnetic carriers, generally made with iron oxide, have been developed for the treatment of tumors located in organs such as brain [6, 7], lungs [2], and liver [8, 9]. Despite an increase in the amount of particles reaching the targeted area [2, 6, 10], such carriers are also delivered to a significant extent to healthy tissues/organs after systemic administration. This moderately controlled process may result in side effects thereby limiting the maximal tolerated dose [11]. Furthermore, since the targeting efficiency depends on the distance between the magnet and the tumor [12, 13], this approach is only applicable for the treatment of superficial cancers, or tumors implanted in small animals. Indeed, the magnetic targeting of deep tissues is highly challenging [2], and is not used in clinical practice [14].

Recently, a new approach referred to as magnetic resonance navigation (MRN) has been proposed to steer and track in real time endovascular magnetic carriers in deep tissues to target areas of interest [15-18], and restrain the systemic carrier distribution. MRN is achieved with a clinical magnetic resonance imaging (MRI) scanner upgraded with an insert of steering coils [18, 19]. The scanner allows tracking the carrier during MRN along a pre-planned trajectory. The magnetic field (1.5 T or higher) of the system enables saturation magnetization (M_s) of ferromagnetic materials throughout the body [15, 17]. Hence, the problem of weaker magnetic field in deep tissues observed with external magnet can be overcome. A magnetic gradient is generated to steer the carrier in a particular direction. Since a clinical MRI scanner generates a 40-mT m^{-1} gradient, only millimeter-scale carriers can be piloted [15, 19]. To achieve MRN of micrometer-scale carriers for therapeutic purposes, steering coils generating a gradient up to 400-mT m^{-1} are needed [16, 18, 19]. Moreover, the successful application of MRN is relying on several medical [16] and MRN parameters such as magnitude of the steering magnetic gradient

[18], Ms and diameter of the carrier [17], blood vessel properties (flow velocity and diameter) [16, 20] and injection site position (Fig. 4.1A).

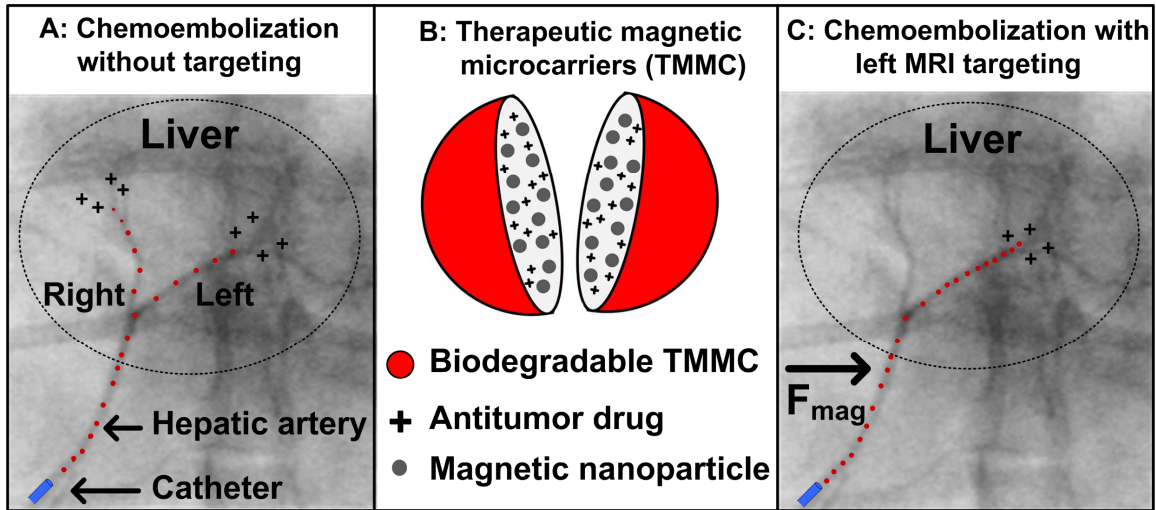


Figure 4. 1: Representation of MRI targeting with TMMC for liver chemoembolization. Images A and C are fluoroscopy images of the rabbit hepatic artery with superposed images of the TMMC distribution without (A) and with (C) the MRI targeting. On image A, the microparticles are released from the catheter in the artery and distributed to both lobes. Image B illustrates a schematic representation of a cut of the TMMC loaded with an antitumor drug and magnetic nanoparticles embedded into a biodegradable matrix. Image C displays the MRI targeting of the left bifurcation using the magnetic force (F_{mag}) to preserve the right lobe from the chemoembolization.

In this manuscript, the conception and *in vivo* steering of therapeutic magnetic microcarriers (TMMC) designed for the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) *via* trans-arterial chemoembolization (TACE) in the hepatic artery (Fig. 4.1) are reported. HCC remains the third cause of death related to cancer [21]. Improvements in current therapeutic modalities are critically required since treatment of unresectable HCC is associated with a low survival rate [22]. By controlling chemoembolic material distribution, MRN could improve embolization and drug concentration in the tumor area while limiting chemoembolization of healthy blood vessels and the hepatic complications [23-25] (Fig. 4.1). The TMMC characteristics such as diameter and drug release profile were based on drug eluting beads (DEB) design. DEB are recognized as promising chemoembolic systems by inducing tumor anoxia due to physical obstruction of blood flow and to the sustained release of a cytotoxic agent (*e.g.* doxorubicin, DOX) [26-29]. The

TMMC consisted of biodegradable poly(D,L-lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) microparticles loaded with the antitumor drug and magnetic nanoparticles for steering and tracking (Fig. 4.1B). In this feasibility study, physiological parameters (of the rabbit) were taken into consideration for designing the TMMC. Our previously published *in vitro* data [16] indicated that the TMMC mean diameter should be 50 μm to get a distal embolization without extravasation in liver parenchyma and that the microparticles should contain 30% FeCo nanoparticles (*w/w*) to give adequate Ms for steering (Fig. 4.1C). FeCo nanoparticles were preferred over iron oxide nanoparticles because of their higher Ms [30] which reduces the magnetic material loading in TMMC [16].

4.3 Materials & methods

4.3.1 FeCo nanoparticles

FeCo nanoparticle synthesis, annealing and preparation for the encapsulation process are described in the supplementary information section.

4.3.2 Encapsulation of FeCo nanoparticles and doxorubicin

Doxorubicin-HCl (15 mg) (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) was stirred with borate buffer (pH=8.6, 6 mL) and dichloromethane (DCM) (400 mL) (ACP, Montréal, QC, Canada). After 24 h, DCM with DOX (400 mL) was extracted from the borate buffer and stored at 4°C. A second extraction step of 24 h was performed with DCM (400 mL). DCM with DOX (800 mL) was evaporated under rotation under vacuum until a volume of 2 mL remained. This solution was added to FeCo nanoparticles (190 mg) in DCM (1.8 mL). Under an argon flux, the volume was reduced to 2.2 mL and then added with PLGA (210 mg) ($M_w = 40,000\text{-}70,000$; L/G molar ratio = 50/50) (Sigma Aldrich). The mixture FeCo-DOX-PLGA-DCM (1.2 mL) was emulsified (5000 rpm, 5 min) with 1% poly(vinyl alcohol) (PVAL, 88% hydrolyzed, $M_w = 13,000\text{-}23,000$) (Sigma Aldrich) aqueous solution (*w/v*) (2.5 mL). Then, the emulsion was transferred to an aqueous

solution of 1% PVAL (10 mL), and DCM was evaporated by rotation under vacuum during 50 min. The microparticles were washed by 4 successive centrifugation-resuspension steps (1000 x g, 5 min). TMMC were collected on a 20- μ m filter. TMMC were sealed under argon atmosphere and stored at -20°C until use.

4.3.3 Characterization experiments

FeCo nanoparticles were imaged with a transmission electron microscopy (TEM) (Jeol 2100F, Tokyo, Japan), and the chemical analysis was determined by energy dispersive spectrometry (EDS) (Inca, Oxford Instrument, Abingdon, U.K). TMMC size distribution was measured by image analysis of data obtained by optical microscopy (Imager Z1, Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). For the fluorescence microscopy analysis, a custom filter set was added to the optical microscope. TMMC were imaged by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM) (Jeol JSM-7600TFE). FeCo nanoparticles and TMMC magnetic properties were measured with a vibrating sample magnetometer (VSM) (Walker Scientific, Worcester, MI) at room temperature. The FeCo nanoparticle loading in TMMC was determined according to Ms measurements [16]. The DOX loading was measured by spectrophotometry at 481 nm (Safire plate reader, Tecan, Durham, NC) following the dissolution of the microparticles in dimethyl sulfoxide (1.5 mL) and FeCo nanoparticle sedimentation by centrifugation (16,000 x g, 5 min).

4.3.4 In vitro steering

The MRI steering setup (supplementary Fig. 4S.3) is described in the supplementary information section. TMMC (3 mg) suspended in 0.9% NaCl solution (7 mL) (Baxter Corporation, Pointe-Claire, QC, Canada) were slowly injected (2.5 mL min⁻¹) with 0.027 lumen Progreat catheter (Terumo, Tokyo, Japan). The catheter tip was placed at 20 or 33 mm from the right/left bifurcation. Each steering assay was repeated at least three times. TMMC were collected at each channel outlet. To determine the steering efficiency, DOX was measured by spectrofluorimetry ($\lambda_{\text{ex}} = 481$, $\lambda_{\text{em}} = 595$) (Safire plate reader).

4.3.5 In vivo steering

Ten New Zealand rabbits ($3.7 \text{ kg} \pm 0.1$, Charles River, QC, Canada) were used. The study was conducted in accordance with the Canadian Council for Animal Care Guidelines and approved by the Ecole Polytechnique de Montréal and the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) animal care committees. Four rabbits received an injection of TMMC with an MRI steering, three rabbits received a TMMC injection without steering as control and three rabbits were used as blank control (without TMMC). Under fluoroscopic visualization, 0.027 lumen Progreat catheter was placed in the proper hepatic artery as far as possible from the right/left bifurcation. A Savvy (5 mm x 2 cm) balloon catheter (Cordis, Bridgewater, NJ) placed in the abdominal aorta at the level of the celiac trunk was inflated to reduce the blood flow velocity during TMMC injection. TMMC (40 mg) in saline solution (18 mL) were slowly injected (1.6 mL min^{-1}). Two hours after TMMC injection, the animal was euthanized with an i.v injection of sodium pentobarbital (120 mg kg^{-1}) (Vetoquinol, Lavaltrie, QC, Canada). The liver was carefully removed and stored in a 10% formalin solution (Chaptec, Pointe-aux-trembles, QC, Canada) at 4°C . For the steering, a 1.5-T Siemens Avento clinical MRI scanner (Siemens, Erlangen, Germany) was used. The rabbit was placed in the center of two gradient coils equipped with a current reversal switch and a power supply (GMW Associates, San Carlos, CA) cooled down with a water cooler system (Opti Temp, Traverse City, MI). The magnetic gradient, generated by applying a 70-A current, depended on the distance between the two coils. Thus, depending of the size of the rabbit, a gradient of $288 \pm 13 \text{ mT m}^{-1}$ was applied. The liver was imaged before and after the TMMC injection with a coronal T2*-weighted gradient-echo sequence with the following parameters: relaxation time (TE) = 3.5 ms, repetition time (TR) = 225 ms, field of view (FOV) = $205 \times 205 \text{ mm}$. To determine the steering efficiency, the TMMC and DOX doses were normalized by the weight of the sample analyzed. Complementary information is described in supplementary information section.

4.3.6 Histological analysis

Each lobe was carefully dissected and three 12-mm thick tissue slices located 4 mm apart were sectioned from each lobe. Liver tissues between each of these slices were used for DOX

analysis. From each 12-mm section, a 4-mm thick slice of tissue was formalin fixed and paraffin-embedded. The remaining pieces were used for cobalt analysis. Each 4-mm thick slice was then cut with a microtome producing 4- μ m sections which were subsequently layered on three slides. One slide was stained with hematoxylin and eosin (H&E) to confirm integrity of the liver parenchyma and one slide was stained with aniline blue to analyse TMMC distribution. Complementary information is described in supplementary information section.

4.3.7 Determination of cobalt levels in the liver

Each slice of each lobe (4 slices per lobe) was weighed (9.3 ± 2.0 g per lobe) and dried at 80°C during 24 h. Then, the tissues were digested with a solution of HNO₃ (63 M) and HCl (36 M) at 80°C. Cobalt concentration was measured with atomic absorption spectrometry (AAS) (S Series AAS, Fisher ThermoScientific, Ottawa, ON, Canada). A blank control group was used to determine Co baseline.

4.3.8 Determination of DOX concentrations *in vitro* and *in vivo*

In vitro release and determination of DOX concentrations in liver and plasma are described in the supplementary information section.

4.3.9 Statistical analysis

In vitro steering results were compared with a student's t-test or an ANOVA test at 5% confidence (Sigma Plot software, Systat Software, Chicago, Il). *In vivo* steering data were compared with the Kruskal-Wallis one-way ANOVA with Dunn's post hoc analysis at 5% confidence. All values presented are expressed as mean \pm standard deviation (s.d.).

4.4 Results and discussion

4.4.1 TMMC properties

FeCo nanoparticles (Fig. 4.2A) were synthesized and annealed to improve M_s (Table 4.1) [16]. The graphite shell surrounding the nanoparticle (Fig. 4.2A), maintained M_s during the encapsulation process. The required amount of FeCo nanoparticles was successfully co-encapsulated with DOX in TMMC (Table 4.1) having the appropriate diameter for liver chemoembolization (Figs 4.2B & 4.2C). The loading of FeCo nanoparticles conferred to TMMC an M_s higher than that of iron oxide microparticles (60 emu g^{-1}) [18]. Following a burst release of 25% occurring within the first 5 min, the TMMC released DOX in a sustained fashion (supplementary Fig. 4S.1). After three days of elution, about 50% of the encapsulated DOX remained in TMMC. The release kinetics of TMMC was typical to that reported with other DOX-loaded PLGA microparticles [31]. TMMC were spherical in shape (Fig. 4.2B), an important feature to permit optimal arterial embolization [32], and steering in all directions relative to the MRI magnetic field [18]. Therefore, TMMC characteristics met all requirements for successful steering and chemoembolization.

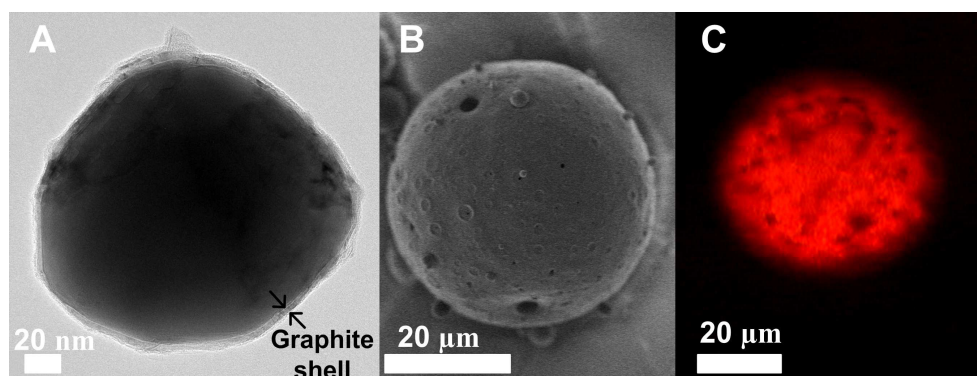


Figure 4. 2: A) TEM image of a FeCo nanoparticle coated with a graphite shell. B) SEM image of a TMMC exhibiting apparent porosity. C) Fluorescence microscopy image of a TMMC. The fluorescence signal comes from the encapsulated DOX.

Table 4. 1: Characteristics of FeCo nanoparticles and TMMC used for *in vivo* MRN. Mean \pm SD ($n=6$).

FeCo nanoparticles	
Diameter (nm)	206 \pm 62
Graphite layer thickness (nm)	10 \pm 4
Atomic ratio Fe:Co (%)	59:41 \pm 3:3
FeCo annealed Ms (emu g ⁻¹)	202 \pm 6
FeCo prior to encapsulation Ms (emu g ⁻¹)	195 \pm 10
TMMC	
Diameter (μ m)	53 \pm 19
Ms (emu g ⁻¹)	72 \pm 3
FeCo nanoparticle loading (% w/w)	37 \pm 2.7
Doxorubicin loading (% w/w)	3.2 \pm 0.5

4.4.2 In vitro steering

In vitro steering was performed in a phantom mimicking the hepatic artery and the right/left bifurcation circulated with real flow velocities (supplementary Fig. 4S.3). Steering efficiency was defined as the reduction of the TMMC (or drug) dose in the untargeted area in the presence of magnetic steering *versus* the negative control (no steering). The effect of four experimental parameters on the steering efficiency was examined: (i) magnetic gradient magnitude, (ii) TMMC steering properties (Ms and diameter), (iii) the distance between the catheter tip and the bifurcation (Fig. 1) and (iv) flow velocity. The last two parameters are critical for clinical application of MRN since catheter position in the artery and flow velocity might change from one subject to the other. Flow velocity is also influenced by the treatment procedure and decreases upon liver embolization [33].

Figure 4.3 shows that in all experimental settings, MRN allowed a reduction of embolization in the non targeted area (steering efficiency $> 0\%$). According to Figure 4.3A, steering efficiency with high flow velocity decreased significantly from 60 to 44% when the gradient decreased from 400 to 200 mT m⁻¹. Hence, the highest gradient should be used for an

efficient MRN. The impact of TMMC diameter (and corresponding M_s) on steering efficiency was assessed in Figure 4.3B. Increasing the TMMC diameter from 30 ($M_s = 49 \text{ emu g}^{-1}$) to 53 μm ($M_s = 72 \text{ emu g}^{-1}$) improved the steering efficiency. In clinical practice, particle diameter below 30 μm could entail the risk of extravasation and lung embolization [32]. According to the steering model shown in supplementary Figure 4S.2, TMMC with diameters greater than 50 μm could further improve the MRN efficiency [16]. However, the chemoembolization with larger particles could also lead to a less distal distribution resulting in a lower dose of DOX delivered to tumor.

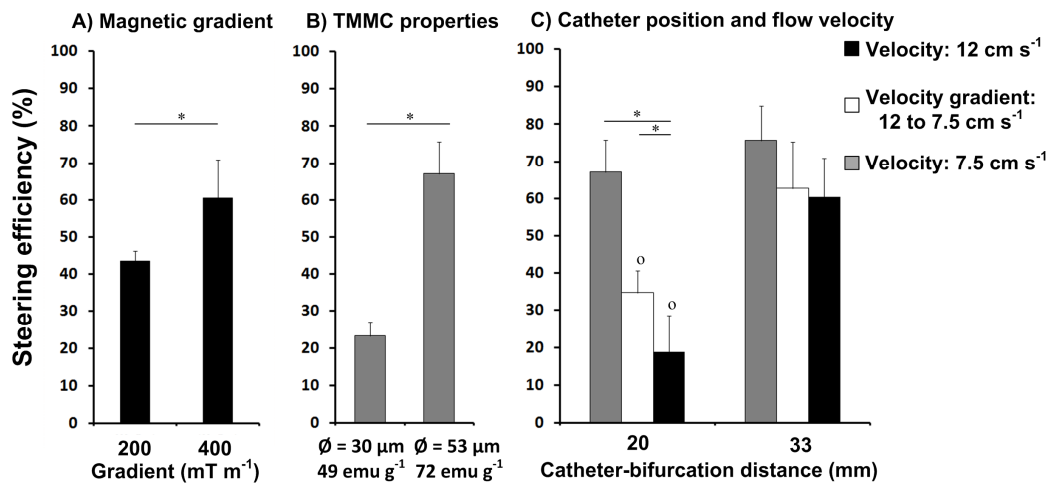


Figure 4. 3: *In vitro* TMMC steering efficiency as a function of the magnetic gradient (A), TMMC steering properties (B), flow velocity and the distance between catheter tip and right/left hepatic artery bifurcation (C). In (A) and (C), TMMC with $M_s = 72 \pm 3 \text{ emu g}^{-1}$ and $\phi = 53 \pm 19 \mu\text{m}$ were used. On (B) and (C), a gradient of $\pm 400 \text{ mT m}^{-1}$ was applied. On (A) and (B) the flow was set at 12 and at 7.5 cm s^{-1} , respectively. On (C) a velocity gradient (from 12 to 7.5 cm s^{-1}) was applied to mimic the flow velocity decrease due to the embolization. On (A) and (B) the catheter tip was placed at 33 and 20 mm, respectively. * $p < 0.05$ between the groups, 0 $p < 0.05$ between the groups catheter-bifurcation = 20 mm and catheter-bifurcation = 33 mm. Mean \pm SD ($n=3$).

On Figure 4.3C, it can be seen that the flow velocity had a major impact on the steering efficiency. It increased from 19 to 67% when the flow velocity decreased from 12 to 7.5 cm s^{-1} (case where the catheter tip was positioned 20 mm from the bifurcation). The reduction of the flow velocity during the experiment (as is expected to occur upon the TMMC injection) led to a steering efficiency of 35%. When the catheter was placed at 33 mm from the bifurcation, no

significant difference in efficiency was observed between the three flow velocities (Fig. 4.3C, last 3 columns). Accordingly, the impact of the flow velocity on steering efficiency was greater when the catheter tip was located close to the bifurcation and was negligible away from it. At moderate flow velocity, the impact of catheter position on efficiency was minimal.

Based on these results and in order to maximize *in vivo* steering efficiency, the catheter should be placed as far away as practically possible from the bifurcation, the flow velocity reduced to its minimum and the highest gradient magnitude applied. In the optimal conditions, the steering efficiency reached 76%, suggesting a real potential of MRN to minimize chemoembolization of the untargeted area.

4.4.3 In vivo steering

In vivo steering efficiency was studied by measuring TMMC and DOX distribution into the right and left lobes according to four methods: (i) magnetic resonance (MR) images of the liver (Fig. 4.4A), (ii) histology analysis (Fig. 4.4B, Fig. 4S.4A), (iii) assay of DOX (Fig. 4S.4B) and (iv) Co (Fig. 4.4C) levels. The distribution ratio between the right and left lobe was compared in the presence and absence of steering. On the T2*-weighted MR images (Fig. 4.4A), TMMC appeared as dark pixels because of the signal loss due to magnetic field inhomogeneity induced by the high TMMC magnetization [34, 35]. After the steering to the left liver bifurcation (Fig. 4.4A), TMMC were mainly localized to the left lobes and the right lobe appeared to be free from TMMC. This qualitative result illustrates the attractive potential of MRN to target a specific area. It also shows that TMMC can be tracked *in situ*, an interesting feature for clinicians. Interventional radiologists will be able to monitor the chemoembolization progress and efficiency. In comparison, the DEB presently used in the clinic are not visible on any imaging modality. They are injected with a contrast agent under fluoroscopic guidance [29].

The histological images (Fig. 4.4B), confirmed that TMMC successfully embolized into the distal branches of the hepatic artery. No TMMC were detected in the liver parenchyma outside the vascular network. According to TMMC and DOX distribution analyses (Fig. 4.4C and

supplementary Fig. 4S.4), MRN significantly controlled the distribution of these therapeutic particles as compared to the control. The same distribution profile into each lobe was obtained for the three analyses, with a correlation coefficient (r) > 0.98 between the methods. The steering to the right or left bifurcation led to an increase in the TMMC deposition in the targeted lobe (Fig. 4.4C). More importantly, a decrease in the TMMC levels in the untargeted lobe was obtained. Regarding the plasmatic DOX concentrations, after a burst effect at 5 min, the drug concentration in the systemic circulation rapidly decreased to very low levels (supplementary Fig. 4S.5). The *in vivo* burst effect correlated well with that observed *in vitro* (supplementary Fig. 4S.1). Moreover, the pharmacokinetic profile resembled that reported for DEB [28].

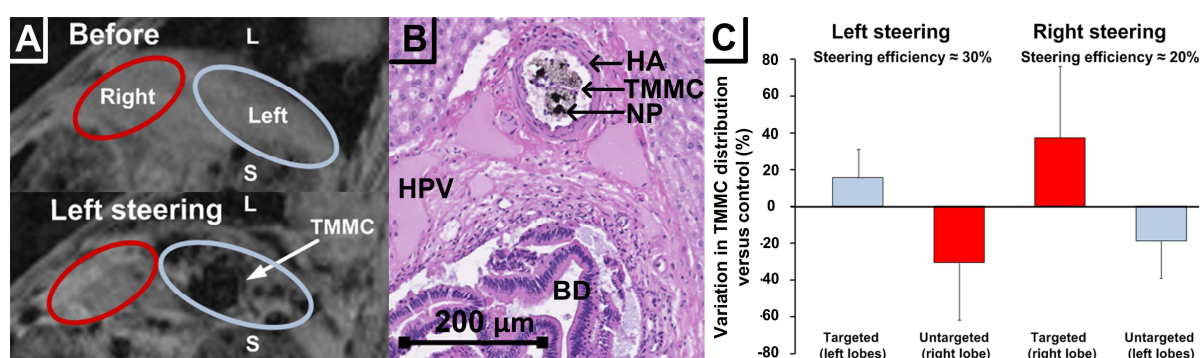


Figure 4. 4: *In vivo* TMMC steering data. Images A represent T2*-weighted MR images of the rabbit liver before and after TMMC left steering. The red line delineates the right lobe and the blue line shows the left lobes. S indicates the stomach and L the lungs. Image B displays a microscopic view of the liver parenchyma and the blood vessels stained with hematoxylin and eosin (HA = branch of hepatic artery; HPV = hepatic portal vein; BD = bile duct; NP = FeCo nanoparticles). TMMC are located within a branch of the hepatic artery. Image C shows the variation in TMMC distribution *versus* control in the liver lobes with left and right steering based on Co analysis. Significant difference ($p = 0.029$) between the steering group ($n = 4$) *versus* the control group ($n = 3$) was obtained. Mean \pm SD.

To the best of our knowledge, this is the first study showing that steering can be achieved in the hepatic artery located at a depth of 4 cm below the skin with moderate blood flow with an MRI scanner. Steering efficiency was higher with the left steering compared to the right steering (Fig. 4.4C and supplementary Fig. 4S.4). Hence, MRN was more efficient to preserve right liver lobe from the chemoembolization than left lobes. Furthermore, the right lobe targeting was better.

As only one third of the TMMC dose reached the right lobe without steering because of the natural difference in blood supply between the lobes according to their weight (right lobe = 22 ± 3 g and left lobes = 33 ± 2 g), the effects of MRN were more important in the right lobe.

Variation in the steering efficiency was observed from one animal to another. This variation could be mainly attributed to the catheter tip position and the blood flow velocity (Fig. 4.1 and Fig. 4.3C). In fact, the catheter position was limited by anatomical constraints and it was generally placed at 20 ± 2 mm from the right/left bifurcation (Fig. 4.1). At this distance, according to the *in vitro* results (Fig. 4.3C), the efficiency is significantly affected by the flow velocity. We supposed that the variation of blood flow velocity between each animal could account for the observed variability. In one experiment, where the catheter tip was placed at a distance greater than 30 mm, the steering efficiency increased to 50%. This result was in good agreement with the *in vitro* steering data (Fig. 4.3C).

The *in vivo* steering efficiency could in principle be improved by the following measures (Fig. 4.3): (i) measuring blood flow prior to MRN and reducing it to an adequate value with a balloon catheter, (ii) embolizing the gastroduodenal artery to place the catheter as far away as possible from the bifurcation, and (iii) increasing the magnetic gradient to 400 mT m^{-1} . In a clinical setting, TMMC could be injected through an implantable arterial catheter positioned in the main hepatic artery equipped with a balloon on its extremity. With this design, it could be possible to perform alternative embolization of the right and left lobe or hyperselective embolization without the need for repetitive catheterization.

4.5 Conclusion

New therapeutic particles for MRI targeting were successfully developed and validated *in vivo* taking into consideration MRN and liver chemoembolization constraints. These particles possessed a very attractive combination of properties: MRN compatibility, MRI tracking property, appropriate diameter for the embolization of hepatic artery branches, and sustained drug

release. MRN was successfully carried out *in vitro* and *in vivo*. MRN in the hepatic artery of these particles to control their distribution in the liver represents a significant step toward the development of tumor targeted therapies and better control over the side effects. This strategy could improve the therapeutic outcome of chemoembolization in patients with poor prognostic outlook. Further work will aim to target a liver tumor to evaluate MRN therapeutic efficacy. In addition, MRN in a vascular network with several bifurcations will be investigated for hyperselective embolization.

4.6 Acknowledgements

This project was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Canada Research Chair program, the Canada Foundation for Innovation (CFI), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). GS was supported by a clinical research scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). The authors acknowledge Julie Hinsinger (UdM) and the histological team (UdM) for their work on the liver preparation, Hélène Héon (CHUM), the animal house care team (CHUM), Jocelyne Lavoie (CHUM), Gilles Beaudoin (CHUM), Gael Bringout (EPM), Charles Tremblay (EPM) and the students from the NanoRobotics laboratory at EPM for their help during *in vivo* tests.

Appendix. Supplementary data

Supplementary methods include FeCo nanoparticle synthesis; theoretical steering; *in vitro/in vivo* MRI steering; *in vitro/in vivo* DOX analysis and histological analysis. Supplementary figures include *in vitro/in vivo* DOX release; theoretical steering; *in vitro* MRI steering setup; and *in vivo* variation in TMMC and DOX distribution versus control. Supplementary data are provided in the on-line version.

4.7 References

1. Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP, Jr., Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:579-81.
2. Dames P, Gleich B, Flemmer A, Hajek K, Seidl N, Wiekhorst F, et al. Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung. *Nat Nanotechnol*. 2007;2:495-9.
3. Amirfazli A. Nanomedicine: magnetic nanoparticles hit the target. *Nat Nanotechnol*. 2007;2:467-8.
4. Dobson J. Cancer therapy: A twist on tumour targeting. *Nat Mater*. 2010;9:95-6.
5. Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:1252-65.
6. Liu HL, Hua MY, Yang HW, Huang CY, Chu PC, Wu JS, et al. Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:15205-10.
7. Chertok B, David AE, Yang VC. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials*. 2010;31:6317-24.
8. Wilson MW, Kerlan RK, Jr., Fidelman NA, Venook AP, LaBerge JM, Koda J, et al. Hepatocellular carcinoma: regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/ conventional angiography suite--initial experience with four patients. *Radiology*. 2004;230:287-93.
9. Kobeiter H, Georgiades CS, Leakakos T, Torbenson M, Hong K, Geschwind JF. Targeted transarterial therapy of Vx-2 rabbit liver tumor with Yttrium-90 labeled ferromagnetic particles using an external magnetic field. *Anticancer Res*. 2007;27:755-60.
10. Namiki Y, Namiki T, Yoshida H, Ishii Y, Tsubota A, Koido S, et al. A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery. *Nat Nanotechnol*. 2009;4:598-606.

11. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett.* 2010;10:3223-30.
12. Polyak B, Fishbein I, Chorny M, Alferiev I, Williams D, Yellen B, et al. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:698-703.
13. Chorny M, Fishbein I, Yellen BB, Alferiev IS, Bakay M, Ganta S, et al. Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:8346-51.
14. Plank C. Nanomedicine: Silence the target. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:544-5.
15. Martel S, Mathieu JB, Felfoul O, Chanu A, Aboussouan E, Tamaz S, et al. Automatic navigation of an untethered device in the artery of a living animal using a conventional clinical magnetic resonance imaging system. *Appl Phys Lett.* 2007;90:114105-1.
16. Pouponneau P, Leroux JC, Martel S. Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization. *Biomaterials.* 2009;30:6327-32.
17. Pouponneau P, Savadogo O, Napporn T, Yahia L, Martel S. Corrosion study of iron-cobalt alloys for MRI-based propulsion embedded in untethered microdevices operating in the vascular network. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;93:203-11.
18. Mathieu JB, Martel S. Steering of aggregating magnetic microparticles using propulsion gradients coils in an MRI Scanner. *Magn Reson Med.* 2010;63:1336-45.
19. Mathieu JB, Martel S. Magnetic microparticle steering within the constraints of an MRI system: proof of concept of a novel targeting approach. *Biomed Microdevices.* 2007;9:801-8.
20. Riegler J, Wells JA, Kyrtatos PG, Price AN, Pankhurst QA, Lythgoe MF. Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system. *Biomaterials.* 2010;31:5366-71.
21. Bruix J, Llovet JM. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2009;373:614-6.

22. Cabibbo G, Latteri F, Antonucci M, Craxi A. Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2009;6:159-69.
23. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002;35:1164-71.
24. Liapi E, Geschwind JF. Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. *J Clin Oncol*. 2007;25:978-86.
25. Kennedy AS, Kleinstreuer C, Basciano CA, Dezarn WA. Computer modeling of yttrium-90-microsphere transport in the hepatic arterial tree to improve clinical outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76:631-7.
26. Liapi E, Geschwind JF. Chemoembolization for primary and metastatic liver cancer. *Cancer J*. 2010;16:156-62.
27. Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*. 2007;46:474-81.
28. Hong K, Khwaja A, Liapi E, Torbenson MS, Georgiades CS, Geschwind JF. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2563-7.
29. Reyes DK, Vossen JA, Kamel IR, Azad NS, Wahlin TA, Torbenson MS, et al. Single-center phase II trial of transarterial chemoembolization with drug-eluting beads for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: initial experience in the United States. *Cancer J*. 2009;15:526-32.
30. Seo WS, Lee JH, Sun X, Suzuki Y, Mann D, Liu Z, et al. FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nat Mater*. 2006;5:971-6.
31. Lin R, Shi Ng L, Wang CH. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials*. 2005;26:4476-85.

32. Hong K, Kobeiter H, Georgiades CS, Torbenson MS, Geschwind JF. Effects of the type of embolization particles on carboplatin concentration in liver tumors after transcatheter arterial chemoembolization in a rabbit model of liver cancer. *J Vasc Interv Radiol*. 2005;16:1711-7.
33. Lopez-Benitez R, Richter GM, Kauczor HU, Stampfl S, Kladeck J, Radeleff BA, et al. Analysis of nontarget embolization mechanisms during embolization and chemoembolization procedures. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2009;32:615-22.
34. Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:10901-6.
35. Gupta T, Virmani S, Neidt TM, Szolc-Kowalska B, Sato KT, Ryu RK, et al. MR tracking of iron-labeled glass radioembolization microspheres during transcatheter delivery to rabbit VX2 liver tumors: feasibility study. *Radiology*. 2008;249:845-54.

4.8 Supplementary information

4.8.1 Supplementary methods

4.8.1.1 FeCo nanoparticle synthesis, annealing and encapsulation preparation

$\text{Co}_2(\text{CO})_8$ (1.00 g) (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and FeCO_5 (1.3 mL) (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) in dichlorobenzene (DCB) (12 mL) (Fisher Scientific) were transferred under inert atmosphere in a solution of DCB (48 mL), tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) (0.4 g) (Sigma aldrich) and oleic acid (OA) (1.8 mL) (Sigma Aldrich) under reflux and steering at 200°C. The temperature was increased until 285°C for 35 min. The solution was then cooled down to room temperature. The colloidal solution was passed through a 0.2- μm filter (Sigma Aldrich). DCB was evaporated under vacuum rotation and FeCo nanoparticles were suspended in hexane (8 mL) (ACP, Montréal, QC, Canada). Nanoparticles were washed three times by centrifugation (45,000 x g, 45 min). The centrifuged particles were resuspended first in hexane (8 mL) and then diluted in ethanol (20 mL) before each centrifugation step. After the last

centrifugation, the nanoparticles were dispersed in hexane (14 mL) and transferred into a crucible. After hexane evaporation, the nanoparticles were annealed under argon atmosphere at 650°C during 35 min as described in reference [1]. Annealed nanoparticles were kept under vacuum prior to their use. To clean the nanoparticles after the annealing, FeCo nanoparticles (190 mg) were suspended in dichloromethane (DCM) (10 mL) (ACP) and homogenised (10,000 rpm, 4 min) (PowerGen 700D, Fisher ThermoScientific). Nanoparticles were placed in an ultrasonic bath during 5 min and then centrifuged (15,000 x g, 10 min). These steps were repeated twice. OA (3 mL) was added to the nanoparticles suspended in DCM (8 mL), and the latter were sonicated (2 min, 60 W with 2 s of pulse ON and 1 s of pulse OFF) (Sonic Dismembrator 550, Fisher ThermoScientific). The sonication step was repeated 12 times to suspend nanoparticles. Then nanoparticles were cleaned by 3 centrifugation steps (15,000 x g, 15 min) in ethanol (20 mL). Nanoparticles were finally resuspended in DCM (1.8 mL), sealed under an argon atmosphere and stored at 4°C until use.

4.8.1.2 In vitro DOX release

In vitro release kinetics were performed under sink conditions. TMMC (10.5 ± 0.2 mg) with phosphate buffered saline (PBS) (5 mL) were placed under rotation at 37°C to maintain microparticles in suspension. At each time point, TMMC were centrifuged (2000 x g, 5 min). The supernatant (600 µL) was taken and replaced by fresh PBS at 37°C [2]. The DOX concentration in the supernatant was measured by spectrophotometry at 481 nm (Safire plate reader, Tecan, Durham, NC). At the end of the experiment, after centrifugation (2000 x g, 5 min), the supernatant was discarded and TMMC were freeze-dried (Freeze Dry System, MI, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) (1.5 mL) was added on the TMMC to determine the remaining encapsulated DOX content according to the method described in the article.

4.8.1.3 Theoretical steering method

During the steering (Fig. 4S.2A), TMMC acquired two velocities: V_{mag} corresponded to the magnetophoretic velocity created by the MRI steering, and V_{blood} corresponded to the velocity

of TMMC dragged by the blood flow. V_{mag} depends of the concentration of encapsulated magnetic nanoparticles (% w/w), the nanoparticle saturation magnetization (M_s) (emu g^{-1}), the nanoparticle density (kg m^{-3}), TMMC volume (m^3), the applied magnetic gradient (T m^{-1}), the TMMC radius (m) and blood viscosity (0.0035 Pa s) [1]. To be steered to the targeted bifurcation, the TMMC should have crossed half of the hepatic artery radius which represents the longest pathway case for the steering. Accordingly, the time required to cross the artery radius determined from V_{mag} should be lower than the time to reach the bifurcation dragged by the blood flow determined by V_{blood} and the distance between the catheter tip and the bifurcation. The comparison of these two times is used to determine TMMC steering properties such as diameter and M_s .

4.8.1.4 Synthesis of TMMC with reduced steering properties ($\varnothing = 30 \pm 9 \mu\text{m}$, $M_s = 49 \pm 6 \text{ emu g}^{-1}$)

These microparticles were synthesized with the same material proportions described in the article. The smaller diameter and nanoparticle loading were obtained by decreasing the penetration depth of the homogenizer probe in the mixture of FeCo-DOX-PLGA-DCM during the emulsion.

4.8.1.5 In vitro steering

The MRI steering setup was composed of a 1.5-T Siemens Sonata clinical MRI scanner (Siemens, Erlangen, Germany), home-made steering gradient coils, one syringe pump (New Era Pump System Inc, Wantagh, NY), a Plexiglas rabbit hepatic artery phantom with a rectangular cross-section (width = 2 mm and depth = 1.57 mm), and an MRI compatible camera (MRC systems GmbH Heidelberg, Germany) directly above the bifurcation of the phantom [1]. The rabbit common hepatic artery is composed of the caudate bifurcation which leads the blood to the caudate lobes, and the right/left bifurcation which leads the blood to the right lobe and to the left lobes (left median lobe and left lateral lobe) [3]. Accordingly, the phantom was composed of the caudate bifurcation placed at 13 mm from the TMMC entrance and the right/left bifurcation

placed at 20 mm from the caudate bifurcation (Fig. 4S.3). An aqueous solution of 40% (w/w) glycerol was used to mimic the blood viscosity [4]. The phantom was placed between two steering coils. This setup was placed in the middle of the MRI tunnel. The flow, obtained with a syringe pump, was set at 7.5 or 12 cm s⁻¹. These values were measured by Doppler ultrasound (US) in the rabbit hepatic artery. To mimic the decrease of the flow velocity during the embolization [5], the velocity was reduced from 12 to 7.5 cm s⁻¹ after the injection of half of the glycerol solution (60 mL) used for a steering test. Steering gradients were +/- 400 or +/- 200 mT m⁻¹ to target each channel outlet (right or left). Collected TMMC were centrifuged (2000 x g, 5 min). The supernatant was discarded and replaced by DMSO (1 mL) to release the encapsulated DOX as previously described.

4.8.1.6 In vivo protocol: complementary information

Rabbits were anesthetized with isoflurane (2-3%) (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada) delivered with an MRI compatible anesthesia machine (Dispomed, Joliette, QC, Canada). During the experiment, the rabbit body temperature was maintained with a circulating water blanket (Cincinnati Sub-Zero, Cincinnati, OH). The pulse rate and the arterial oxygen saturation were monitored with an MRI compatible pulse oximeter (STARR Life Sciences Corp., Oakmont, PA). An arteriotomy was conducted on the right and left femoral artery and a 4-Fr micropuncture introducer (Cook Medical Inc, Bloomington, IN) was placed on the right side to introduce the microcatheter whereas the balloon catheter was directly placed over a 0.018 wire in the left femoral artery. In the blank animal group, we have observed spasm on the hepatic artery after performing external Doppler US, probably related to the compression of the artery on the catheter induced by the US probe. Hence, we decided to not measure blood flow velocity by US prior to TMMC injection. To minimize the magnetic aggregation of TMMC during their injection, a tubing (1.27-mm internal diameter) (Cole-Parmer, Montréal, QC, Canada) was connected to the catheter and the injection was done at 1.5 m from MRI scanner. In the steering group, one rabbit received half of the TMMC dose (20 mg in 18 mL of saline solution) to confirm that the steering efficiency was not affected by the injected dose. Blood samples (1 mL) were taken at 15 min before and at 5, 10, 20, 40, 60 and 120 min after the TMMC injection. During the necropsy, the main hepatic artery and the gastroduodenal artery were ligatured to prevent the TMMC reflux.

For the determination of the steering efficiency, the TMMC dose found in the left medial lobe and left lateral lobe were added and referred as left lobes because the steering platform used could only target one bifurcation (right/left).

4.8.1.7 TMMC distribution by histological analysis

Whole slide scanning was performed on stained sections using an automated digital slide scanner (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). In each slide, the TMMC surface was measured in each blood vessel with the NDP.view software (Hamamatsu Photonics). Then, the sum of the TMMC surfaces in one lobe was divided by the weight of the liver sample cut for the slide preparation. The TMMC distribution in each lobe was determined by the sum of the TMMC surfaces in the lobe divided by the total sum of the TMMC surfaces in the right and left lobes.

4.8.1.8 Plasmatic DOX concentration analysis

Fresh blood sample in EDTA coated tube (1.6 mg EDTA per mL of blood) was centrifuged (1550 x g, 3 min). Plasma was collected and stored at -20°C. DOX was extracted from the plasma according to the following procedure: plasma (50 µL) was added to the internal standard solution (100 µL) composed of daunorubicin in methanol (10 ng mL⁻¹). The solution was centrifuged (15,680 x g, 10 min) and was kept at 4°C prior to its analysis. It was injected (17 µL) in a liquid chromatography-mass spectrometry system (LC-MS/MS). The system was composed of a high-performance liquid chromatography (HPLC) (Prominence, Shimadzu Prominence system, Columbia, MD), an MS equipped with an electrospray source in a positive mode of ionization (API 4000, AB Sciex Instruments, Concord, ON, Canada), a guard column (Zorbax XDB-8, 12.5 x 2.1 mm, Agilent Technologies Canada Inc, Mississauga, ON, Canada), and an analytical column (Zorbax SB-C18, 3.5 µM, 2.1 x 50 mm, Agilent Technologies Canada Inc). An acetonitrile (ACN) (mobile phase B) gradient (7-50%) in water containing 0.05% (v/v) formic acid (mobile phase A) were used as mobile phases at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. An equilibration time of 4 min was set between each injection. DOX and daunorubicin were

determined by multiple reaction monitoring (MRM) scan mode (in a positive mode of ionization). MRM transitions were $544 \rightarrow 397$ (DOX) and $528 \rightarrow 321$ (daunorubicin). For the calibration standard curve, DOX concentrations in plasma spanned between 100 to 10,000 pg mL⁻¹. The method was validated with quality control standards and system suitability prior and after the sample injection. MRM chromatograms were integrated using Analyst software v.1.4.2. (AB Sciex Instruments).

4.8.1.9 DOX quantification in the liver

Liver samples dedicated to DOX analysis were weighed (4.9 ± 0.6 g per lobe) and homogenized (2-3 min) (PT 10/35, Brinkmann, Mississauga, ON, Canada) with Milli-Q-water (2 mL per g of liver). Formic acid (100 μ L per g of liver), daunorubicin as internal standard (18 μ L per g of liver), and ACN (5.6 mL per g of liver) were added and homogenized (2-3 min). 66%-methanol-water solution (v/v) (1 mL per g of liver) was added and the mixture was vortexed (30 s). The homogenized liver solutions were centrifuged ($3500 \times g$, 10 min). A sample of the supernatant (1000 μ L) was evaporated (24 h) to remove the organic solvent. Then, formic acid (88%) (6 μ L) and methanol (164 μ L) were added to each sample. The samples were centrifuged ($15,680 \times g$, 5 min) and stored at 4 °C. The sample (15 μ L) was then analysed with the same system described for the plasmatic DOX concentration analysis. The standard curve was obtained by added free-DOX to blank liver (non-treated with TMMC) and submitted to the same protocol as previously described. The DOX concentration was calculated per g of liver and the standard curve concentration range was between 1 to 270 ng of DOX per g of liver. The extraction and analysis method were validated by measuring blank liver containing a known amount of TMMC. For the statistical analysis, in the control group, one lobe was lost during the analysis process ($n = 2$ for the control group); thus no statistical analysis was possible.

4.8.2 Supplementary figures

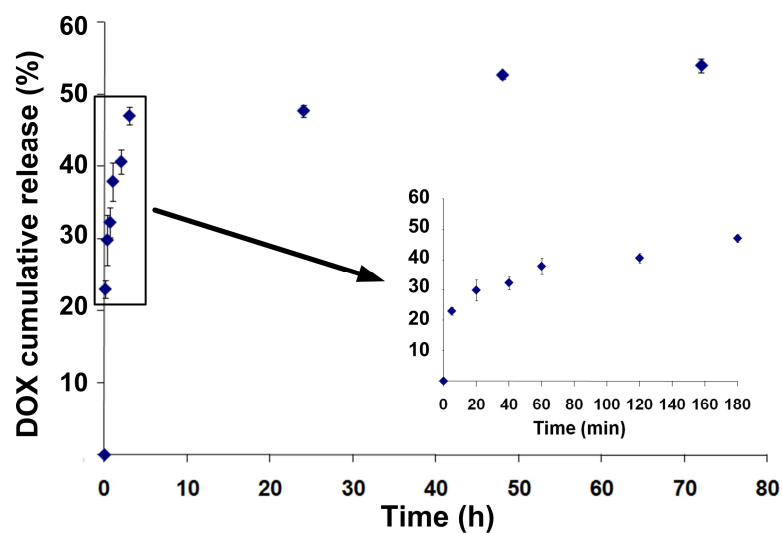


Figure 4S. 1: *In vitro* DOX release from TMMC in PBS buffer at 37°C under sink conditions. At the end of the assay, TMMC contained $54 \pm 1\%$ of the initial encapsulated DOX amount. Mean \pm SD (n=3).

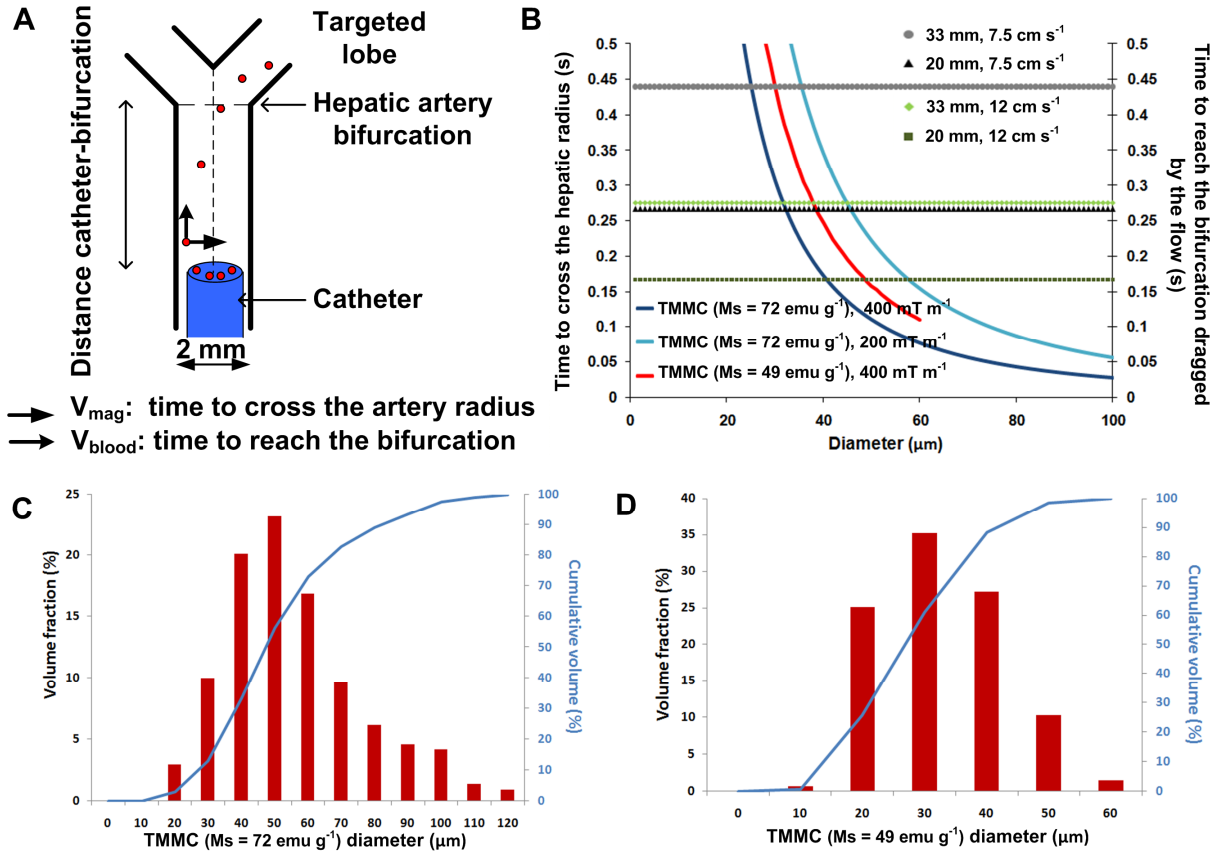


Figure 4S. 2: Theoretical steering of the TMMC as a function of diameter, magnetic gradient applied, flow velocity and distance between the catheter and the bifurcation. Image A displays a schematic view of the TMMC steering in the rabbit hepatic artery. B) Comparison of the time required to cross the hepatic artery radius and the time to reach the bifurcation dragged by the flow according to the distance between the catheter and the bifurcation, the magnetic gradient applied, TMMC characteristics (diameter and M_s) and the flow velocity (12 or 7.5 cm s^{-1}). C) and D) images display the size distribution and the cumulative distribution of TMMC with $M_s = 72 \text{ emu g}^{-1}$ and with $M_s = 49 \text{ emu g}^{-1}$, respectively.

According to our theoretical steering model based on V_{mag} and V_{blood} (Fig. 4S.2B), to steer a TMMC ($M_s = 72 \text{ emu g}^{-1}$) with a gradient of 400 mT m^{-1} with a flow of 7.5 cm s^{-1} with a catheter placed at 20 mm from the bifurcation, the TMMC diameter should be at least of 32 μm . When the flow was set up at 12 cm s^{-1} , this value increased to 42 μm . Consequently based on the size distribution, the volume fraction of TMMC suspension which could not be steered can be determined for different catheter tip positions and different flow velocities. For the two examples

previously described, the cumulative volume which could not be steered reached 17 and 40%, respectively. By taking into consideration in our model the *in vitro* steering parameters, a significant difference in steering efficiency (Fig. 3) was achieved when the cumulative volume, which could not be steered, reached at least 20%. Our basic steering model could help to choose the appropriate TMMC formulation depending on the vascular network targeted.

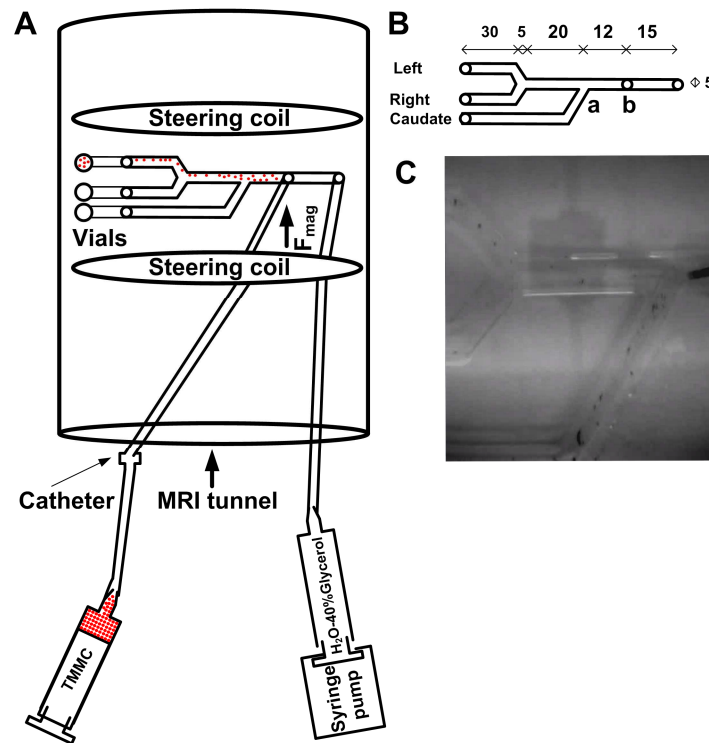


Figure 4S. 3: *In vitro* steering MRI setup. Image A represents a schematic view of the MRI steering setup. Image B is a schematic view of the hepatic artery phantom with its dimensions. On the image, a and b refer to the position of the catheter tip. Image C displays a frame extracted during the recording of a TMMC steering test when the catheter was placed at 20 mm from the bifurcation.

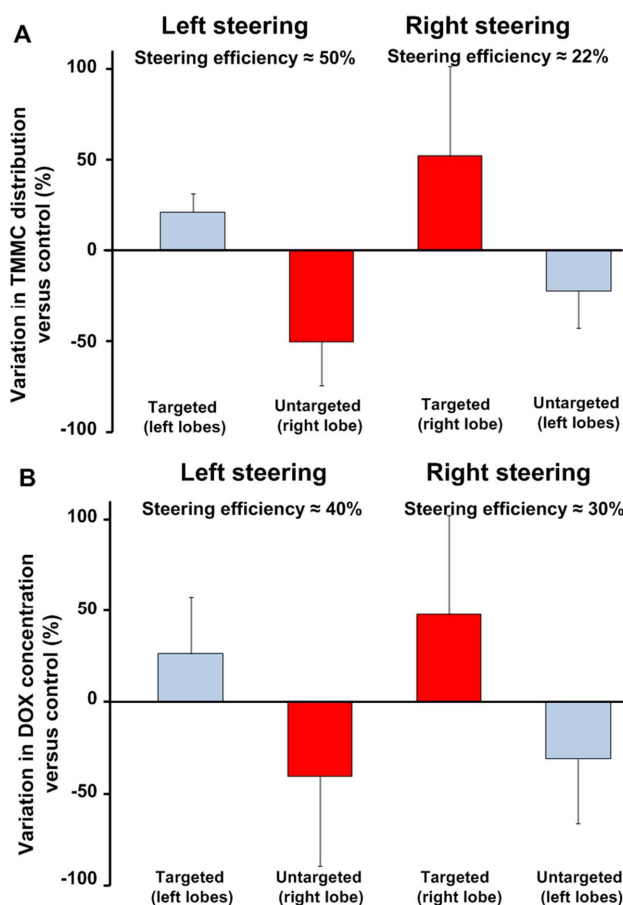


Figure 4S. 4: *In vivo* variation in TMMC distribution determined by histology (A) and in DOX concentration (B) *versus* control. The same TMMC distribution profile obtained with the Co analysis was achieved with these two analyses. Good correlation coefficients were found between the TMMC/DOX distribution obtained with the three methods: $r = 0.99$ for AAS and histology results, $r = 0.99$ for AAS and DOX results, and $r = 0.98$ for DOX and histology results. These data confirm that MRN can significantly control the TMMC distribution in the liver. Mean \pm SD (n=4).

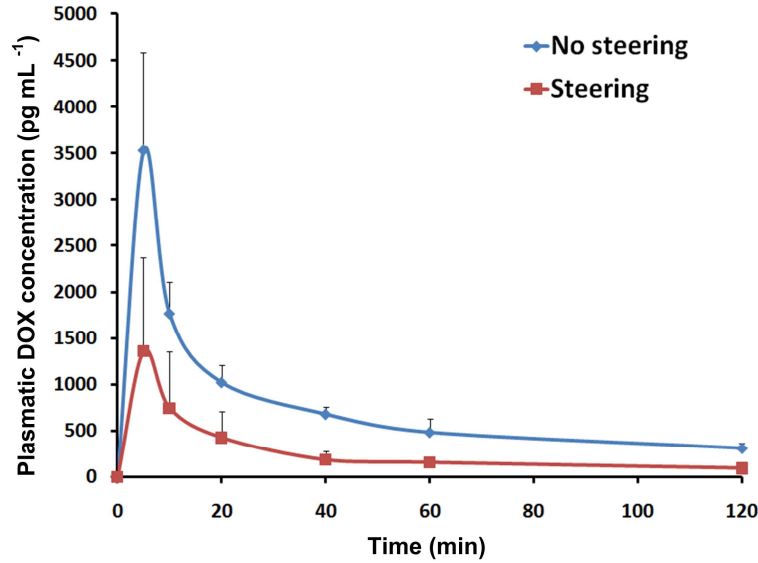


Figure 4S. 5: Plasmatic DOX concentration after TMMC injection. The values were rationalized by the injected dose. The burst effect occurred at 5 min after the injection in both groups. The area under the plasmatic concentration *vs.* time curve (AUC) in the steering group ($AUC = 8505 \pm 4975$) was significantly lower than the one in the control group ($AUC = 23485 \pm 5171$).

Accordingly, the steering could reduce the plasmatic DOX concentration. This result could be attributed to the slight aggregation of the TMMC occurring during the injection due to the MRI scanner magnetic field [1]; the aggregation reduced the contact surface with the blood. It was shown that when DEB diameter increased, the plasmatic DOX concentration was reduced because of the reduction of the contact surface [6]. The steering could have an additional impact on the plasmatic concentration by reducing the contact with the blood; TMMC deposited mainly in one lobe. Additional experiments are required to determine if this effect was due to the steering or to the magnetic TMMC aggregation during the injection. Mean \pm SD (n=3).

4.8.3 Supplementary References

1. Pouponneau P, Leroux JC, Martel S. Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization. *Biomaterials*. 2009;30:6327-32.
2. Lin R, Shi Ng L, Wang CH. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials*. 2005;26:4476-85.
3. Lee KH, Liapi E, Buijs M, Vossen J, Hong K, Georgiades C, et al. Considerations for implantation site of VX2 carcinoma into rabbit liver. *J Vasc Interv Radiol*. 2009;20:113-7.
4. Kharin NA, Vince DG. Moderately nonlinear ultrasound propagation in blood-mimicking fluid. *Ultrasound Med Biol*. 2004;30:501-9.
5. Lopez-Benitez R, Richter GM, Kauczor HU, Stampfl S, Kladeck J, Radeleff BA, et al. Analysis of nontarget embolization mechanisms during embolization and chemoembolization procedures. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2009;32:615-22.
6. Liapi E, Lee KH, Georgiades CC, Hong K, Geschwind JF. Drug-eluting particles for interventional pharmacology. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2007;10:261-9.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 Nanoparticules fer-cobalt

Cette section traite de l'utilisation des nanoparticules FeCo à travers leur fabrication, leurs propriétés, leur biocompatibilité et elle se termine par l'utilisation des nanoparticules de fer dans les TMMC.

5.1.1 Fabrication et utilisation des nanoparticules FeCo

L'utilisation des nanoparticules FeCo pour une application biomédicale est relativement récente et constitue un défi technologique. Plusieurs méthodes de fabrication par voie physique [4, 208] ou par voie chimique [28, 103] ont été étudiées. Dans cette recherche, la synthèse par voie chimique a été choisie en raison de son coût et de sa capacité à fabriquer des quantités suffisantes pour la réalisation des TMMC. Le recuit des nanoparticules a permis la diffusion du carbone vers la surface et la restauration de la phase cubique à faces centrées [6, 25, 28, 43, 180]. Ceci a optimisé la M_s (Figure 3. 4). Néanmoins, le recuit a entraîné l'agrégation partielle des nanoparticules qui fut difficilement contrôlable [43, 92].

Dans le domaine biomédical, l'utilisation de ces nanoparticules a été étudiée pour l'hyperthermie [101], la séparation magnétique [215] et comme agent de contraste IRM [110, 208]. Cependant, les applications restent peu nombreuses en partie à cause de la difficulté de fabriquer et d'utiliser ces nanoparticules tout en préservant leurs propriétés magnétiques. Leur oxydation rapide diminue leur M_s [4, 103]. Elle chute de 225 emu g^{-1} (nanoparticules FeCo) [28, 43, 208, 235] à 80 emu g^{-1} (nanoparticules CoFe_2O_4) [5, 145]. L'oxydation a été limitée par une coquille de graphite (Figure 3. 3) [178, 208, 226, 244, 245] ou par une couche d'oxyde de magnésium [151]. À ce jour, la seule application *in vivo* des nanoparticules FeCo où elles conservent leur M_s est comme agent de contraste. Une couche de graphite d'une épaisseur de 1 nm a protégé la M_s [110, 208]. Comparées aux nanoparticules commerciales d'oxyde de fer, ces

nanoparticules ont permis une imagerie plus précise des vaisseaux sanguins (jusqu'à 100 μm de diamètre) [110].

5.1.2 Biocompatibilité des nanoparticules FeCo

L'utilisation de ces nanoparticules soulève des questions concernant leur toxicité pour l'organisme en partie à cause de la présence du cobalt [13]. Une étude a montré que l'alliage FeCo présentait une toxicité cellulaire et une résistance en corrosion limitée, entraînant une libération d'ions de cobalt et de fer [183]. Il a été suggéré qu'un traitement de surface serait nécessaire pour éviter la libération d'ions. Deux études ont montré que les nanoparticules FeCo recouvertes d'une couche de graphite n'induisaient pas d'effets toxiques chez des modèles d'animaux [110, 208]. Selon les auteurs, la structure de graphite a empêché la libération d'ions métalliques. Malgré ces résultats prometteurs, une étude de biocompatibilité devra être conduite sur les TMMC dans le cadre d'une chimio-embolisation dans un lapin. Cette étude comprendra quatre types de microparticules: (i) des microparticules de PLGA, (ii) des microparticules avec élution de DOX, (iii) des microparticules chargées avec des nanoparticules FeCo et (iv) les TMMC. Cette recherche permettra de mesurer la toxicité des nanoparticules et de la comparer à celle de la doxorubicine. Les paramètres étudiés seront: les réactions inflammatoires, la concentration plasmatique des ions métalliques, la distribution des nanoparticules dans le foie, dans les vaisseaux sanguins (dépôt par sédimentation lors de la dégradation des TMMC) et dans la rate, les reins, les poumons et le cœur.

5.1.3 Utilisation des nanoparticules de fer

Si les nanoparticules FeCo induisent une toxicité lors de l'utilisation des TMMC, il est envisageable de les remplacer par des nanoparticules de fer. En effet, le fer est mieux toléré par l'organisme que le cobalt [26, 206]. De récents travaux ont montré que des nanoparticules de fer recouvertes par une structure de graphite ou de silice conservaient une Ms de 170 emu g^{-1} [57, 73, 226, 246]. Avec ces nanoparticules, le chargement doit être de 40 % (m/m) pour conserver la Ms des TMMC. Les résultats de cette thèse montrent que ce chargement est réalisable. Si le chargement en nanoparticules doit rester à 30 % (m/m), le diamètre des microparticules doit

augmenter de 10 μm environ. Enfin, en dernier recours, les nanoparticules d'oxyde de fer ($M_s = 90 \text{ emu g}^{-1}$) peuvent être utilisées [31, 50, 85]. Cependant, pour obtenir des propriétés équivalentes aux TMMC, il faut éviter l'oxydation des nanoparticules pendant leur encapsulation [30] et augmenter le chargement et le diamètre des microparticules (Figure 3. 2).

5.2 TMMC

Cette section traite des propriétés des TMMC par rapport aux microparticules de PLGA chargées avec de la DOX ou des nanoparticules magnétiques, aux DEB et aux vecteurs magnétiques pour le traitement du CHC.

5.2.1 TMMC et les microparticules de PLGA

Le PLGA a été choisi, car il est biocompatible et biodégradable [213]. Il permet d'encapsuler la doxorubicine [88, 128] ou des nanoparticules magnétiques [174, 237]. De plus, les microparticules à base de PLGA ou PLA ont été testées pour le traitement du CHC par radioembolisation [231] et chimio-embolisation [9, 187].

Une étude a montré des microparticules de PLGA ($\varnothing = 4 \mu\text{m}$) qui présentaient un profil de libération de la DOX proche de celui des TMMC (Figure 4S. 1) [128]. La libération instantanée ('burst release') de l'agent anticancéreux a été attribuée à sa libération de la surface des microparticules de PLGA [91, 248]. En effet, pendant la fabrication des microparticules, lors de l'élimination du solvant, la substance encapsulée était drainée vers la surface [196]. La vitesse de libération instantanée dépendait de la taille de la particule: plus le diamètre de la microparticule augmentait et plus la vitesse de libération diminuait [128, 155]. Après cette première phase de libération, l'élution de la DOX se faisait par diffusion à travers des micropores formés par hydratation, érosion et dégradation [155]. Les images en microscopie électronique à balayage ont mis en évidence la présence de quelques pores dans les TMMC (Figure 4. 2). Ainsi, cette porosité a dû influencer la cinétique de libération de la DOX. Par ailleurs, il a été montré que la dégradation de microparticules de PLGA d'un diamètre inférieur à 300 μm était homogène

[213]; la vitesse de dégradation du corps était équivalente à celle de la surface. Ainsi, il est possible que les TMMC aient une dégradation homogène. Une étude sur la dégradation des TMMC *in vitro* et *in vivo* permettra de compléter les travaux de cette thèse. L'étude *in vitro* déterminera le profil complet de la libération de la DOX et des nanoparticules. Une étude *in vivo* sur un CHC permettra d'évaluer le comportement de la tumeur (taille et vascularisation) en fonction de la libération de l'agent anticancéreux et de la dégradation des TMMC. Dans cette étude, la distribution de la DOX dans le tissu et la tumeur sera mesurée [171].

Dans ce projet de recherche, les TMMC ont été fabriquées avec un PLGA ayant un ratio PGA:PLA de 50:50 et une masse molaire comprise entre 40 000 et 70 000 g/mol. Il a été montré que la dégradation de microparticules de ce polymère durait plusieurs semaines [213]. Si les paramètres de libération de la DOX et de dégradation des TMMC doivent être modifiés afin de maximiser l'efficacité thérapeutique, les paramètres suivants doivent être pris en considération: le ratio entre PLA et PGA, la masse molaire [91], la porosité [49, 65], la méthode de fabrication [41, 91] et le pH du milieu [248]. Aussi, il sera intéressant de caractériser l'effet du chargement en nanoparticules dans les TMMC sur la libération de la DOX. En perspective, il faut noter que le PLGA offre aussi la possibilité d'encapsuler d'autres agents anticancéreux [242] et des oligonucléotides [42].

Tableau 5. 1: Encapsulation de nanoparticules magnétiques (NI= non indiqué)

Nanoparticules	Particules	Diamètre	Ms	Ref
Fe ₃ O ₄	PLGA	150 < Ø < 300 nm	10 emu g ⁻¹	[237]
Fe ₃ O ₄	PLGA	240 ± 55 nm	NI	[3]
Fe ₃ O ₄	PLGA	120 < Ø < 200 nm	75x10 ⁻³ emu g ⁻¹	[93]
Fe ₃ O ₄	PLGA	280 nm	42 emu g ⁻¹	[174]
Fe ₃ O ₄	PLA	0.66 µm	24.8 emu g ⁻¹	[211]

Plusieurs encapsulations de nanoparticules Fe_3O_4 dans des particules de PLGA ou de PLA ont été reportées dans la littérature (Tableau 5. 1). Le diamètre des particules de PLGA a varié selon le temps et la puissance de sonication durant le procédé d'émulsification [29, 30]. Les nanoparticules ont formé des agrégats dans les particules [29]. Ce phénomène a été observé avec les TMMC (Figure 3. 3). En outre, la magnétisation des particules dépendait linéairement du pourcentage de magnétite (Fe_3O_4) encapsulée [30, 37, 38]. De plus, la M_s des nanoparticules a baissé au cours de leur encapsulation à cause de leur oxydation [30]. Ainsi, elle n'a pas excédé 50 emu g^{-1} . Enfin, des nanoparticules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ($\varnothing = 8 \text{ nm}$, $M_s = 66 \text{ emu g}^{-1}$, chargement = 6 % (m/m)) et du paclitaxel ont été co-encapsulés dans des microparticules de PLA ($\varnothing = 972 \pm 68 \text{ nm}$, $M_s = 4,1 \text{ emu g}^{-1}$) [82]. La diffusion de l'agent anticancéreux a été accélérée par hyperthermie (50 Hz, 750 G).

5.2.2 TMMC et les microparticules à élution d'un agent anticancéreux

Les propriétés des DEB ont été utilisées pour la conception des TMMC. La comparaison des TMMC avec les DEB porte sur l'élution de la DOX, l'embolisation et leur suivi en imagerie. Les TMMC ont permis une libération de la DOX sur plusieurs jours comme les DEB (Figure 4S. 1). Cependant, il est difficile de comparer la cinétique de libération de ces deux types de microparticules, car les DEB avec un diamètre de $50 \mu\text{m}$ ne sont pas étudiées actuellement [127]. Par ailleurs, dans ce projet de recherche, la quantité de DOX encapsulée a été limitée par son coût. Ainsi, il n'a pas été possible d'étudier son chargement maximal dans les TMMC et de le comparer aux DEB. Les résultats *in vivo* ont montré que les TMMC permettaient l'embolisation et la libération de la DOX comme les DEB. Lors du traitement d'un CHC avec les TMMC, la distance entre la tumeur et l'embolisation ainsi que la diffusion de la DOX dans le tissu devront être mesurées et comparées avec les DEB. En outre, il n'existe pas encore sur le marché de DEB radio-opaques ou visibles en IRM [156]. Par conséquent, les radiologistes sont obligés d'injecter les microparticules avec une solution radio-opaque. Ainsi, des microparticules pouvant être directement suivies aux rayons X ou/et en IRM sont en cours de développement [70, 72, 170]. Les TMMC, visibles en IRM (Figure 4. 4), permettent leur suivi sans irradier les tissus.

5.2.3 TMMC et les microparticules magnétiques pour le CHC

La Ms des TMMC est supérieure à celles des les microparticules magnétiques pour le CHC sauf pour les particules de la compagnie FeRx [198]. Ces particules et les TMMC seront comparées ultérieurement dans ce chapitre (section 5.4). Il ne semble pas exister de système combinant la chimio-embolisation avec un ciblage magnétique. Les microparticules pour le CHC sont magnétiques soit pour être suivies en IRM [70, 112, 170] ou pour l'hyperthermie [164]. Les TMMC ont été facilement détectés en IRM. Pour l'hyperthermie, dont le but est d'accélérer la libération de la DOX ou d'augmenter la température dans la zone tumorale, les TMMC pourraient générer de la chaleur grâce au cycle d'hystérésis des nanoparticules FeCo (Figure 3. 4) [165, 167, 227]. Pour l'hyperthermie par la relaxation de Néel ou de Brown, il faudra encapsuler des nanoparticules FeCo monodomaines [101, 117, 208]. Il a été montré *in vitro* que les nanoparticules FeCo, par rapport à celles de magnétite, augmentaient plus rapidement la température du milieu grâce à leur plus grand moment magnétique [101]. Ainsi, ces nanoparticules pourraient être très utilisées pour chauffer efficacement un CHC malgré son refroidissement rapide par sa vascularisation [164, 177]. Il sera donc intéressant d'étudier l'hyperthermie avec les TMMC.

5.3 Guidage des TMMC

Cette section traite du guidage *in vitro/ in vivo*, des montages *in vitro*, du modèle théorique de la MRN, du protocole de radiologie interventionnelle et des paramètres influençant l'efficacité de guidage.

5.3.1 Guidage *in vitro*

Ce projet de recherche a nécessité le développement d'expériences de guidage *in vitro* dans des conditions physiologiques et de radiologie interventionnelle et de méthodes pour déterminer l'efficacité de guidage.

Le premier modèle de l'artère hépatique utilisé (Figure 3S. 1) a permis de valider la conception des TMMC en contrôlant la vitesse d'injection des TMMC et la vitesse du flot. Par rapport au modèle théorique, l'efficacité de guidage mesurée était plus élevée en raison de l'agrégation des TMMC [40, 154, 195]. Ces agrégats se sont formés avant le guidage, car les particules ont été directement injectées dans le tunnel de l'IRM (Figure 3S. 1). Cependant, l'agrégation doit être minimisée afin de permettre la MRN dans les vaisseaux sanguins jusqu'à la tumeur. En outre, comme l'injection *in vivo* des TMMC se fait par un cathéter, un nouveau montage de l'artère hépatique a été réalisé (Figure 4S. 3). Il faut noter que le diamètre du cathéter, et donc sa lumière interne, était limité par celui de l'artère hépatique du lapin. Quand les TMMC ont été injectées dans le cathéter aux abords du tunnel de l'IRM, l'agrégation a provoqué son occlusion. Par conséquent, une tubulure a été connectée à l'entrée de ce dernier (Figure 4S. 3). Ainsi, l'injection des TMMC sans agrégats a été effectuée à 1,5 m de l'IRM.

Les résultats obtenus ont mis en évidence l'interaction entre les différents paramètres et leur prépondérance sur l'efficacité de guidage. L'utilisation de deux formulations des TMMC a démontré que les propriétés de ces microparticules dépendaient du réseau vasculaire ciblé. Ces expériences ont aussi montré qu'il était difficile de guider un vecteur de taille plus petite. Ce dernier point a été confirmé *in vitro* par le guidage en IRM de cellules chargées en nanoparticules [195] et d'agrégats de nanoparticules [40]. Cependant, les vitesses du flot utilisées restaient très inférieures aux vitesses physiologiques. Quand la vitesse du flot était proche d'une valeur physiologique, l'efficacité de guidage était très faible, voire nulle. Selon les auteurs, la magnétisation des nanoparticules (nanoparticules d'oxyde de fer) et le faible volume magnétique à guider étaient responsables de cette efficacité limitée.

Les résultats de ces essais *in vitro* (Figure 3. 5, Figure 4. 3) ont mis aussi en évidence que le modèle théorique de la MRN (Figure 3. 2, Figure 4S. 2) permettait d'évaluer la faisabilité du guidage. Dans le cadre d'une application clinique, ce modèle pourrait être utilisé pour choisir les propriétés des TMMC selon les paramètres physiologiques du CHC.

5.3.2 Guidage *in vivo*

Le lapin a été choisi comme modèle animal, car il permet l'implantation d'une tumeur VX2 qui présente des propriétés vasculaires analogues au CHC [111]. Ce modèle est couramment utilisé pour évaluer l'efficacité préclinique de nouvelles chimio-embolisations [162]. Avant de réaliser un guidage *in vivo*, il a fallu mettre au point le protocole de radiologie interventionnelle pour: (i) placer le cathéter dans l'artère hépatique propre à une distance satisfaisante de la bifurcation droite/gauche, (ii) placer le cathéter ballon dans l'aorte afin de réduire le débit sanguin dans l'artère hépatique pendant le guidage et (iii) déterminer les paramètres des séquences d'IRM. La réduction du flot sanguin par un cathéter ballon a été une solution sécuritaire. Cette étape est importante pour le guidage vers une tumeur, car la vitesse d'écoulement du sang dans l'artère hépatique augmente avec la vascularisation d'un CHC [89].

Les résultats des expériences *in vivo* confirmèrent ceux obtenus lors des essais *in vitro*. Cependant, de part les contraintes anatomiques, le cathéter d'injection des TMMC n'a pas pu toujours être placé dans l'artère hépatique à une distance de 20 mm de la bifurcation gauche/droite. Ainsi, quand le cathéter fut plus près de la bifurcation, il était impératif que la vitesse du sang soit réduite à son minimum sans provoquer une thrombose de l'artère hépatique ou des spasmes [104, 173]. Ce dernier point a été difficile à maîtriser et affecta l'efficacité de guidage. Une solution pour les futurs essais consiste à emboliser l'artère gastroduodénale pour placer le cathéter dans l'artère hépatique principale. La distance entre l'artère hépatique principale et la bifurcation gauche/droite chez le lapin était généralement autour de 20 mm. Cette procédure est sécuritaire et elle est appliquée pour le traitement des CHC chez l'humain [60].

Différentes méthodes ont été développées pour évaluer l'effet du guidage sur la distribution des microparticules. À cause de l'embolisation, chaque lobe a dû être traité dans son intégralité [216]. Pour déterminer la distribution des TMMC selon les concentrations en ions métalliques, l'analyse du cobalt a été préférée à celle du fer, car la concentration de cet élément dans le foie était infime [166, 175]. Pour de futures expériences de guidage, il est conseillé d'étudier les interactions entre les TMMC et le tissu avec des coupes histologiques et de quantifier la distribution en dosant la DOX et/ou le cobalt. Ces deux méthodes sont viables.

La plateforme de guidage utilisée dans les expériences *in vivo* contenait des éléments métalliques non compatibles avec l'IRM. Par conséquent, l'imagerie du foie n'était possible que quand la plateforme était à l'extérieur du système. Ceci empêcha le suivi de l'embolisation pendant le guidage. Cependant, une nouvelle plateforme a été récemment acquise par le laboratoire de Nanorobotique permettant d'alterner l'imagerie et le guidage [149, 154]. Ainsi, pour les nouvelles expériences de MRN, un bolus de TMMC sera guidé puis imagé afin de vérifier si le débit sanguin n'est pas trop élevé. L'imagerie permettra aussi de s'assurer qu'il n'y a pas de reflux des particules au cours de l'embolisation vers les zones saines [60, 102]. Cette nouvelle plateforme permettra aussi d'étudier l'effet de l'agrégation des TMMC sur le guidage. En effet, la légère agrégation magnétique des microparticules observée au cours de la MRN doit être quantifiée afin d'assurer une embolisation distale de la tumeur. De plus, la biodistribution des TMMC dans les organes (reins, poumons, cœur, rate) pourra être évaluée qualitativement par IRM, car les microparticules produisent une perte de signal caractéristique.

5.4 Ciblage avec la MRN et ciblage avec des aimants externes

Cette section commence par les résultats majeurs de ciblage avec un champ magnétique et se poursuit avec son application pour le CHC.

Des résultats expérimentaux, obtenus sur des animaux et quelques patients, ainsi que des travaux de modélisation [67, 168, 212] ont montré que les limitations du ciblage des tissus profonds avec un aimant externe étaient: (i) la taille et la magnétisation des nanoparticules [38, 139], (ii) la diminution du gradient magnétique avec la distance entre la source et la zone ciblée [139, 182] et (iii) les conditions physiologiques [225]. De plus, une modélisation a montré qu'il était possible de capter des microparticules ($\varnothing = 1 \mu\text{m}$) dans des artérioles de $50 \mu\text{m}$ avec un aimant placé à une distance de 50 mm de la cible [59]. Par conséquent, pour que la rétention magnétique fonctionne, il faut que les particules soient injectées dans les petites artères et artérioles le plus près possible de la zone tumorale. Ce type d'injection est extrêmement difficile à réaliser en clinique. De plus, ces résultats ont mis en évidence que le contrôle de la distribution

des particules avec cette approche lors d'une injection par voies intraveineuse systémique ou intra-artérielle restait très difficile.

Le foie, étant un organe profond, il est difficile de générer un champ et un gradient magnétique avec un aimant externe suffisamment fort pour contrôler la distribution des particules [58]. Les expériences *in vivo* de ciblage d'un CHC avec de nouveaux vecteurs sont généralement réalisées en plaçant l'aimant soit directement sur le foie en ouvrant la cage thoracique [120] ou alors dans des petits animaux où la distance entre l'aimant et la tumeur reste inférieure à 10 mm [29, 140, 185]. De plus, les études de ciblage maintiennent l'aimant entre 30 min à 48 heures après l'injection pour augmenter la capture du vecteur. Il en résulte un temps de procédure long. Ainsi, ces modes opératoires restent très difficiles, voire impossibles à obtenir dans des conditions cliniques [181]. Le projet le plus abouti sur le ciblage d'un CHC avec un aimant externe reste les travaux réalisés par la compagnie FeRx (Figure 1. 13). Cependant, l'essai clinique de phase II/III fut arrêté, car aucune différence significative sur la régression tumorale n'avait été obtenue par rapport au contrôle. Il est possible que les difficultés techniques rencontrées à l'échelle humaine (placement de l'aimant, injection difficile des particules dans les branches nourricières de la tumeur, durée de l'intervention et débit sanguin supérieur à celui des essais *in vitro*) aient conduit à l'arrêt de cette méthode [241]. Ainsi, ces différents travaux ont montré que cette approche de ciblage nécessite à l'échelle humaine des vecteurs thérapeutiques dont la taille est de l'ordre du micromètre et d'excellentes propriétés magnétiques.

La modélisation de guidage des TMMC a montré (Figure 3. 2, Figure 4S. 2) clairement que la MRN dans les artères ne pouvait fonctionner qu'avec un vecteur de plusieurs dizaines de micromètres. Ce point est analogue avec les contraintes du ciblage avec un aimant. Cependant, le contrôle de la distribution du vecteur par la MRN permettrait en théorie d'amener toute la dose injectée à la tumeur. Ce point diffère du piégeage magnétique qui dépend du passage occasionnel du vecteur. En outre, pour réaliser un guidage avec un aimant externe, il faut être capable de placer très précisément le champ magnétique. Ce qui reste difficile à l'échelle humaine [241]. En utilisant des TMMC, le ciblage avec un aimant externe du lobe gauche/droit du foie pourra être comparé avec celui par MRN.

5.5 Considérations pour l'utilisation des TMMC à l'échelle humaine

Dans cette partie, le modèle de guidage théorique a été utilisé pour concevoir des TMMC pour une navigation dans l'artère hépatique propre humaine suivie d'un guidage dans la bifurcation droite (Tableau 5. 2). Cette modélisation n'a pas pris en compte les variations anatomiques de l'artère hépatique [77, 87, 214]. Les paramètres considérés étaient les suivants: diamètre moyen de l'artère hépatique (4,4 mm) [8, 214], longueur de l'artère hépatique propre (27 mm) [8], distance entre la bifurcation gauche/droite et la bifurcation suivante (6,7 mm) et diamètre de l'artère hépatique droite (2,9 mm) [8]. Cette modélisation constituait un cas critique parce que le sens du gradient devait être changé après la première bifurcation et la longueur de la deuxième bifurcation était courte. La vitesse moyenne du flot sanguin considérée dans l'artère hépatique propre était de 28 cm s^{-1} et dans l'artère hépatique droite de 31 cm s^{-1} [23, 90]. Des calculs ont été effectués avec des vitesses plus élevées à cause des variations interindividuelles [89] et, qu'en raison de la présence d'une tumeur, la vitesse du sang augmentait dans l'artère hépatique ($0,55 \text{ L min}^{-1}$). Une vitesse inférieure à celle moyenne a été aussi considérée dans le cas d'un placement d'un cathéter ballon. Dans cette modélisation, le diamètre des TMMC a été déterminé selon le taux de chargement en nanoparticules FeCo, le gradient magnétique et la vitesse du flot.

Tout d'abord le diamètre moyen des TMMC avec un taux de chargement de 30 % en nanoparticules FeCo doit passer de $52 \mu\text{m}$ chez le lapin à un diamètre de $81 \mu\text{m}$ chez l'homme (Tableau 5. 2). Ensuite, si la vitesse du flot est plus élevée, il faut utiliser des TMMC avec un taux de chargement de 30 % d'un diamètre moyen autour de $100\text{-}120 \mu\text{m}$. En considérant la navigation dans la seconde bifurcation qui est un cas plus critique, le diamètre des TMMC doit être autour de $150 \mu\text{m}$. D'un point de vue clinique, des DEB avec un diamètre entre 100 et $300 \mu\text{m}$ sont recommandées afin de réaliser une embolisation la plus distale possible de la tumeur. Ceci permet une bonne diffusion de l'agent anticancéreux dans le tissu [171]. Il est donc recommandé d'utiliser pour la MRN chez l'homme au niveau de l'artère hépatique propre des microparticules ayant un diamètre entre $100\text{-}150 \mu\text{m}$.

Tableau 5. 2: Propriétés des TMMC pour un guidage au niveau de l'artère hépatique propre humaine et dans l'hépatique droite.

1^{ère} bifurcation gauche-droite				
Cathéter-bifurcation = 27 mm, diamètre de l'artère hépatique = 4,4 mm				
Vitesse du sang (cm s⁻¹)	Gradient (mT m⁻¹)	Chargement (%)	Ms (emu g⁻¹)	Diamètre (μm)
15	600	30	69	48
15	400	30	69	59
15	200	30	69	83
28	600	30	69	66
28	500	30	69	72
28	400	30	69	81
28	300	30	69	93
28	200	30	69	114
28	100	30	69	161
28	400	10	23	140
28	400	50	115	63
45	400	30	69	101
45	300	30	69	117
60	400	30	69	117
2^{ème} bifurcation				
Bifurcation-bifurcation = 6,7 mm, diamètre de l'artère hépatique droite = 2,9 mm				
Vitesse du sang (cm s⁻¹)	Gradient (mT m⁻¹)	Chargement (%)	Ms (emu g⁻¹)	Diamètre (μm)
15	400	30	69	96
15	200	30	69	135
31	400	30	69	140

Cette modélisation constitue un autre exemple d'interdépendance entre le réseau vasculaire ciblé et les propriétés des TMMC. Ainsi, deux alternatives sont possibles: soit fabriquer des TMMC qui permettent une navigation dans la majorité des cas, soit des séries de TMMC avec des propriétés différentes. Dans le premier cas, une étude exhaustive sur la vascularisation des tumeurs du foie devra être effectuée pour déterminer les caractéristiques les plus fréquentes. Dans le deuxième cas, on peut envisager des microparticules avec un chargement en nanoparticules FeCo de 30 % et un chargement en DOX de 5 % et trois séries de diamètre: 80-100 μm, 100-125 μm et 125-150 μm. Ensuite, on peut envisager des variantes sur le chargement

en nanoparticules ou en DOX selon l'individu et l'état de la tumeur. Des microparticules ($\varnothing = 100\text{-}160\text{ }\mu\text{m}$) pour la chimio-embolisation de PLA ont été fabriquées par émulsion [65]. Ceci permet d'envisager que le procédé de fabrication actuel des TMMC pourrait être utilisé pour réaliser les microparticules à l'échelle humaine.

CONCLUSION

Ce projet de recherche visait le développement, la fabrication et l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des TMMC, le premier vecteur thérapeutique pouvant être guidé dans un réseau vasculaire par la navigation par résonance magnétique.

Les TMMC développées pour la chimio-embolisation du foie ont répondu aux objectifs demandés et validé les hypothèses de recherches. Les TMMC étaient des microparticules biodégradables en PLGA chargées avec des nanoparticules FeCo (37 % *m/m*) et de la doxorubicine (3,2 % *m/m*). Les nanoparticules FeCo présentaient une magnétisation à saturation de 205 emu g⁻¹. Ces nanoparticules ferromagnétiques, dont le diamètre était de 200 nm, ont été recouvertes d'une couche de graphite d'une épaisseur de 10 nm qui les protégea de l'oxydation et permit ainsi le maintien de leurs propriétés magnétiques. Les TMMC présentaient plusieurs fonctions: l'embolisation des branches de l'artère hépatique par leur diamètre de 50 µm, une libération progressive de l'agent anticancéreux sur plusieurs jours, un fort contraste en IRM sur les séquences T2* permettant leur détection dans le tissu et des propriétés de guidage (diamètre et Ms de 72 emu g⁻¹) permettant la MRN au niveau de l'artère hépatique.

Le guidage *in vitro* a été étudié grâce au développement de modèles de l'artère hépatique et de sa bifurcation gauche/droite dans des conditions physiologiques et de radiologie interventionnelle. Son efficacité a été évaluée par plusieurs méthodes (analyse des vidéos de guidage, dosage du fer, du cobalt et de la DOX). L'efficacité de guidage correspondait à la réduction par la MRN de la concentration de TMMC dans la zone non ciblée par rapport au contrôle négatif. Cette efficacité illustra le potentiel de ces microparticules pour diminuer l'embolisation des tissus sains du foie. L'efficacité dépendait des propriétés des TMMC (diamètre et Ms). Elle augmentait avec l'aggrégation des microparticules. Elle diminuait avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement (7,5 à 12 cm s⁻¹), la réduction du gradient (400 à 200 mT m⁻¹) et de la distance entre le cathéter et la bifurcation (30 à 20 mm). Dans les conditions optimales, elle atteignit 70 %.

Le guidage *in vivo* a nécessité le développement d'un protocole de radiologie interventionnelle propre à la MRN (placement des cathéters, réduction de la vitesse d'écoulement du sang et détermination des paramètres des séquences IRM). La distribution des TMMC dans chaque lobe a été déterminée par une analyse histologique et un dosage de la DOX et du cobalt. La MRN dans l'artère hépatique a permis de contrôler la distribution des microparticules dans les lobes gauche/droit du foie. La concentration des TMMC a augmenté dans le lobe ciblé et elle a diminué fortement dans celui non ciblé. L'efficacité de guidage dépendait de la réduction du débit sanguin et de la position du cathéter par rapport à la bifurcation. Dans les conditions optimales, l'efficacité de guidage atteint 50 %. Dans le cadre d'un traitement d'un CHC, la MRN des TMMC pourrait traiter plusieurs nodules en plaçant un seul cathéter au niveau de l'artère hépatique. Les patients présentant un sombre pronostic pourront donc être traités grâce à la diminution des effets secondaires de la chimio-embolisation.

Avant d'évaluer l'efficacité thérapeutique, il faut tout d'abord réaliser la navigation des TMMC dans une succession de vaisseaux sanguins. Cet objectif pourra être réalisé avec la plateforme de guidage récemment acquise par le laboratoire de Nanorobotique. Elle permet d'imager et de générer des gradients dans les trois directions de l'espace en alternance. Cette plateforme permettra aussi d'évaluer l'effet de l'agrégation magnétique des TMMC sur l'embolisation des branches de l'artère hépatique. Après, il faudra évaluer le ciblage d'une tumeur avec et sans MRN. Il faudra quantifier la distribution des TMMC dans les vaisseaux tumoraux, dans les vaisseaux sains et dans les lobes sans tumeur. Des caractérisations complémentaires des TMMC pourront être réalisées comme l'étude de la libération de la DOX et des nanoparticules ainsi que la dégradation des microparticules sur plusieurs semaines. Il sera aussi intéressant d'étudier l'hyperthermie des TMMC à la fois comme moyen pour accélérer la libération de l'agent anticancéreux et aussi pour chauffer la zone tumorale.

Enfin, l'efficacité thérapeutique des TMMC pourra être évaluée sur plusieurs semaines avec les quatre groupes suivants: TMMC sans guidage (groupe 1), TMMC avec guidage (groupe 2), microparticules FeCo-PLGA avec guidage (groupe 3), microparticules PLGA chargées avec de la DOX (groupe 4). Dans le groupe 2, deux taux de chargement en DOX pourront être évalués.

Les groupes 1 et 2 permettront d'évaluer l'effet de la MRN, les groupes 2 et 3 celui de l'embolisation par rapport à la chimio-embolisation dans le cadre d'une MRN, et les groupes 2 et 4 celui de la chimio-embolisation classique par rapport à la MRN des TMMC. Cette étude permettra aussi d'étudier la toxicité des nanoparticules FeCo.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. B. AMESUR, A. B. ZAJKO, and B. I. CARR, "Chemo-embolization for unresectable hepatocellular carcinoma with different sizes of embolization particles," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 53, pp. 1400-4, 2008.
- [2] A. AMIRFAZLI, "Nanomedicine: magnetic nanoparticles hit the target," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 467-8, 2007.
- [3] C. E. ASTETE, C. S. S. R. KUMAR, and C. M. SABLIOV, "Size control of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 299, pp. 209-216, 2007.
- [4] J. BAI and J.-P. WANG, "High-magnetic-moment core-shell-type FeCo-Au/Ag nanoparticles," *Applied Physics Letters*, vol. 87, pp. 1-3, 2005.
- [5] N. BAO, L. SHEN, P. PADHAN, and A. GUPTA, "Self-assembly and magnetic properties of shape-controlled monodisperse Co Fe₂O₄ nanocrystals," *Applied Physics Letters*, vol. 92, 2008.
- [6] D. I. BARDOS, "Mean magnetic moments in BCC FE-CO alloys," *Journal of Applied Physics*, vol. 40, pp. 1371-1372, 1969.
- [7] C. BARTOLOZZI, V. BATTAGLIA, and E. BOZZI, "HCC diagnosis with liver-specific MRI--close to histopathology," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 125-30, 2009.
- [8] C. A. BASCIANO, C. KLEINSTREUER, A. S. KENNEDY, W. A. DEZARN, and E. CHILDRESS, "Computer modeling of controlled microsphere release and targeting in a representative hepatic artery system," *Annals of Biomedical Engineering* vol. 38, pp. 1862-79, 2010.
- [9] P. BASTIAN, R. BARTKOWSKI, H. KOHLER, and T. KISSEL, "Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 46, pp. 243-54, 1998.

- [10] E. BEN-JOSEF, *et al.*, "Phase II trial of high-dose conformal radiation therapy with concurrent hepatic artery floxuridine for unresectable intrahepatic malignancies," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, pp. 8739-47, 2005.
- [11] J.-P. BENHAMOU, J. BIRCHER, N. MCINTYRE, M. RIZZETTO, and J. RODÉS, *Hépatologie clinique*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 2002.
- [12] J.-P. BENHAMOU and S. ERLINGER, *Maladies du foie et des voies biliaires*, 5^{ième} ed. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 2007.
- [13] G. BHABRA, *et al.*, "Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, pp. 876-83, 2009.
- [14] J. I. BILBAO, *et al.*, "Biocompatibility, inflammatory response, and recanalization characteristics of nonradioactive resin microspheres: histological findings," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 32, pp. 727-36, 2009.
- [15] A. M. BLAMIRE, "The technology of MRI--the next 10 years?," *British Journal of Radiology*, vol. 81, pp. 601-17, 2008.
- [16] C. BOUTROS, P. SOMASUNDAR, S. GARREAN, A. SAIED, and N. J. ESPAT, "Microwave coagulation therapy for hepatic tumors: review of the literature and critical analysis," *Surgical Oncology*, vol. 19, pp. 22-32, 2010.
- [17] K. BRILEY-SAEBO, *et al.*, "Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging," *Cell and Tissue Research*, vol. 316, pp. 315-23, 2004.
- [18] D. B. BROWN, *et al.*, "Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 17, pp. 225-32, 2006.
- [19] J. BRUIX and J. M. LLOVET, "Major achievements in hepatocellular carcinoma," *Lancet*, vol. 373, pp. 614-6, 2009.
- [20] J. BRUIX and M. SHERMAN, "Management of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 42, pp. 1208-36, 2005.

- [21] G. CABIBBO and A. CRAXI, "Hepatocellular cancer: optimal strategies for screening and surveillance," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 142-7, 2009.
- [22] G. CABIBBO, F. LATTERI, M. ANTONUCCI, and A. CRAXI, "Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma," *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, vol. 6, pp. 159-69, 2009.
- [23] K. M. CARLISLE, M. HALLIWELL, A. E. READ, and P. N. WELLS, "Estimation of total hepatic blood flow by duplex ultrasound," *Gut*, vol. 33, pp. 92-7, 1992.
- [24] B. I. CARR, "Hepatic arterial ⁹⁰Yttrium glass microspheres (Therasphere) for unresectable hepatocellular carcinoma: interim safety and survival data on 65 patients," *Liver Transpl*, vol. 10, pp. S107-10, 2004.
- [25] G. CHA HYUN, H. KIM YOUNG, W. KIM CHANG, and S. KANG YOUNG, "Preparation of aqueous dispersion of colloidal -Fe nanoparticle by phase transfer," *Sensors and Actuators: B. Chemical*, vol. 126, pp. 221-5, 2007.
- [26] L. W. CHANG, L. MAGOS, and T. SUZUKI, *Toxicology of metals*. United States of America: CRC Press, Inc., 1996.
- [27] M. CHAPARRO, L. GONZALEZ MORENO, M. TRAPERO-MARUGAN, J. MEDINA, and R. MORENO-OTERO, "Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 28, pp. 1269-77, 2008.
- [28] G. S. CHAUBEY, *et al.*, "Synthesis and stabilization of FeCo nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, pp. 7214-5, 2007.
- [29] J. CHEN, H. WU, D. HAN, and C. XIE, "Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer," *Cancer Letters*, vol. 231, pp. 169-75, 2006.
- [30] L.-B. CHEN, F. ZHANG, and C.-C. WANG, "Rational synthesis of magnetic thermosensitive microcontainers as targeting drug carriers," *Small*, vol. 5, pp. 621-628, 2009.

- [31] F. Y. CHENG, *et al.*, "Characterization of aqueous dispersions of Fe(3)O(4) nanoparticles and their biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 729-38, 2005.
- [32] B. CHERTOK, A. E. DAVID, and V. C. YANG, "Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 6317-24, 2010.
- [33] M. CHORNY, *et al.*, "Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 8346-51, 2010.
- [34] C. CHOULY, D. POULIQUEN, I. LUCET, J. J. JEUNE, and P. JALLET, "Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution," *Journal of Microencapsulation*, vol. 13, pp. 245-55, 1996.
- [35] O. CLEMENT, *et al.*, "Mechanisms of action of liver contrast agents: impact for clinical use," *Journal of Computer Assisted Tomography*, vol. 23 Suppl 1, pp. S45-52, 1999.
- [36] W. B. COLEMAN, "Mechanisms of human hepatocarcinogenesis," *Current Molecular Medicine*, vol. 3, pp. 573-88, 2003.
- [37] L. CROCETTI and R. LENCIONI, "Thermal ablation of hepatocellular carcinoma," *Cancer Imaging*, vol. 8, pp. 19-26, 2008.
- [38] P. DAMES, *et al.*, "Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 495-9, 2007.
- [39] J. E. DANCEY, *et al.*, "Treatment of nonresectable hepatocellular carcinoma with intrahepatic ⁹⁰Y-microspheres," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 41, pp. 1673-81, 2000.
- [40] N. J. DARTON, *et al.*, "Manipulation and tracking of superparamagnetic nanoparticles using MRI," *Nanotechnology*, vol. 19, 2008.
- [41] J. A. DE MORAES NAMUR, *et al.*, "Poly-lactide-co-glycolide microparticle sizes: a rational factorial design and surface response analysis," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, pp. 2403-7, 2006.

- [42] G. DE ROSA, A. BOCHOT, F. QUAGLIA, M. BESNARD, and E. FATTAL, "A new delivery system for antisense therapy: PLGA microspheres encapsulating oligonucleotide/polyethyleneimine solid complexes," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 254, pp. 89-93, 2003.
- [43] C. DESVAUX, P. LECANTE, M. RESPAUD, and B. CHAUDRET, "Structural and magnetic study of the annealing of Fe-Co nanoparticles," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, pp. 103-109, 2010.
- [44] S. DHARANCY, *et al.*, "Comparison of two techniques of transarterial chemoembolization before liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a case-control study," *Liver Transplantation*, vol. 13, pp. 665-71, 2007.
- [45] A. M. DI BISCEGLIE, "Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 13, pp. S169-71, 2002.
- [46] J. DOBSON, "Cancer therapy: A twist on tumour targeting," *Nature Materials*, vol. 9, pp. 95-6, 2010.
- [47] S. DOOLEY, H. WENG, and P. R. MERTENS, "Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 93-101, 2009.
- [48] O. DUDECK, *et al.*, "Local arterial infusion of superparamagnetic iron oxide particles in hepatocellular carcinoma: A feasibility and 3.0 T MRI study," *Investigative Radiology*, vol. 41, pp. 527-35, 2006.
- [49] M. DUNNE, O. I. CORRIGAN, and Z. RAMTOOLA, "Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1659-1668, 2000.
- [50] J. D. DURAN, J. L. ARIAS, V. GALLARDO, and A. V. DELGADO, "Magnetic colloids as drug vehicles," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, pp. 2948-83, 2008.
- [51] G. ELIZONDO, *et al.*, "Hepatic cirrhosis and hepatitis: MR imaging enhanced with superparamagnetic iron oxide," *Radiology*, vol. 174, pp. 797-801, 1990.

- [52] O. ERNST, *et al.*, "Treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial chemoembolization: comparison of planned periodic chemoembolization and chemoembolization based on tumor response," *American Journal of Roentgenology*, vol. 172, pp. 59-64, 1999.
- [53] B. ESCUDIER, *et al.*, "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 356, pp. 125-34, 2007.
- [54] E. EYOL, A. BOLEIJ, R. R. TAYLOR, A. L. LEWIS, and M. R. BERGER, "Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin," *Clinical & Experimental Metastasis*, vol. 25, pp. 273-282, 2008.
- [55] P. A. FARAZI and R. A. DEPINHO, "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, pp. 674-87, 2006.
- [56] M. A. FEITELSON, J. PAN, and Z. LIAN, "Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy," *Surgical Clinics of North America*, vol. 84, pp. 339-54, 2004.
- [57] R. FERNANDEZ-PACHECO, *et al.*, "Highly magnetic silica-coated iron nanoparticles prepared by the arc-discharge method," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 1188-92, 2006.
- [58] J. P. FORTIN-RIPOCHE, *et al.*, "Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: feasibility," *Radiology*, vol. 239, pp. 415-24, 2006.
- [59] E. J. FURLANI and E. P. FURLANI, "A model for predicting magnetic targeting of multifunctional particles in the microvasculature," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 312, pp. 187-193, 2007.
- [60] J. GATES, G. G. HARTNELL, K. E. STUART, and M. E. CLOUSE, "Chemoembolization of hepatic neoplasms: safety, complications, and when to worry," *Radiographics*, vol. 19, pp. 399-414, 1999.
- [61] J. E. GOIN, *et al.*, "Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with intrahepatic yttrium 90 microspheres: a risk-stratification analysis," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 16, pp. 195-203, 2005.

- [62] M. V. GONZALEZ, *et al.*, "Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and in-vitro:in-vivo correlation," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, pp. 767-75, 2008.
- [63] S. GOODWIN, C. PETERSON, C. HOH, and C. BITTNER, "Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy," *Proceedings of 1998 2nd International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, May 28-May 30 1998: Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 194, pp. 132-139, 1999.
- [64] S. C. GOODWIN, C. A. BITTNER, C. L. PETERSON, and G. WONG, "Single-dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier," *Toxicological Sciences*, vol. 60, pp. 177-83, 2001.
- [65] C. GRANDFILS, P. FLANDROY, and R. JÉRÔME, "Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials," *Journal of Controlled Release*, vol. 38, pp. 109-122, 1996.
- [66] C. GRANDIN, *et al.*, "Benign hepatocellular tumors: MRI after superparamagnetic iron oxide administration," *Journal of Computer Assisted Tomography*, vol. 19, pp. 412-8, 1995.
- [67] A. D. GRIEF and G. RICHARDSON, "Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 293, pp. 455-463, 2005.
- [68] S. GRUTTADAURIA, *et al.*, "Adult to adult living-related liver transplant: report on an initial experience in Italy," *Dig Liver Dis*, vol. 39, pp. 342-50, 2007.
- [69] Y. GUO, *et al.*, "Irreversible electroporation therapy in the liver: longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma," *Cancer Research*, vol. 70, pp. 1555-63, 2010.
- [70] T. GUPTA, *et al.*, "MR tracking of iron-labeled glass radioembolization microspheres during transcatheter delivery to rabbit VX2 liver tumors: feasibility study," *Radiology*, vol. 249, pp. 845-54, 2008.

- [71] U. HAFELI, G. PAUER, S. FAILING, and G. TAPOLSKY, "Radiolabeling of magnetic particles with rhenium-188 for cancer therapy," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 225, pp. 73-78, 2001.
- [72] A. HAGIT, B. SOENKE, B. JOHANNES, and M. SHLOMO, "Synthesis and characterization of dual modality (CT/MRI) core-shell microparticles for embolization purposes," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1600-7, 2010.
- [73] Y. C. HAN, J. K. HEO, Y. H. KIM, and Y. S. KANG, "Heating temperature effect on the magnetic property of -fe nanoparticle," *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, vol. 472, pp. 69-75, 2007.
- [74] D. HANAHAHAN and R. A. WEINBERG, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, pp. 57-70, 2000.
- [75] Y. X. HE and Q. Y. GUO, "Clinical applications and advances of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) in the diagnosis of liver neoplasms," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 84, pp. 246-51, 2008.
- [76] A. P. HEMINGWAY and D. J. ALLISON, "Complications of embolization: analysis of 410 procedures," *Radiology*, vol. 166, pp. 669-72, 1988.
- [77] J. R. HIATT, J. GABBAY, and R. W. BUSUTTIL, "Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases," *Annals of Surgery*, vol. 220, pp. 50-2, 1994.
- [78] J. L. HINSHAW and F. T. LEE, JR., "Cryoablation for liver cancer," *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, vol. 10, pp. 47-57, 2007.
- [79] K. HONG, C. S. GEORGIADES, and J. F. GESCHWIND, "Technology insight: Image-guided therapies for hepatocellular carcinoma--intra-arterial and ablative techniques," *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, vol. 3, pp. 315-24, 2006.
- [80] K. HONG, *et al.*, "New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, pp. 2563-7, 2006.

- [81] K. HONG, H. KOBEITER, C. S. GEORGIADIS, M. S. TORBENSON, and J. F. GESCHWIND, "Effects of the type of embolization particles on carboplatin concentration in liver tumors after transcatheter arterial chemoembolization in a rabbit model of liver cancer," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 16, pp. 1711-7, 2005.
- [82] Y. HONG, Y. SHI, P. S. CASEY, and C. GAN MOOG, "Synthesis and properties of poly(D,L-lactide) drug carrier with maghemite nanoparticles," *Materials Science and Engineering: C (Materials for Biological Applications)*, vol. 30, pp. 618-23, 2010.
- [83] H. HURWITZ, *et al.*, "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, pp. 2335-42, 2004.
- [84] S. A. HUSSAIN, *et al.*, "Hepatocellular carcinoma," *Annals of Oncology*, vol. 12, pp. 161-72, 2001.
- [85] A. HUTTEN, *et al.*, "New magnetic nanoparticles for biotechnology," *Journal of Biotechnology*, vol. 112, pp. 47-63, 2004.
- [86] K. H. HWANG, D. J. CHOI, S. Y. LEE, M. K. LEE, and W. CHOE, "Evaluation of patients with hepatocellular carcinomas using [(11)C]acetate and [(18)F]FDG PET/CT: A preliminary study," *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 67, pp. 1195-8, 2009.
- [87] K. ISHIGAMI, Y. ZHANG, S. RAYHILL, D. KATZ, and A. STOLPEN, "Does variant hepatic artery anatomy in a liver transplant recipient increase the risk of hepatic artery complications after transplantation?," *American Journal of Roentgenology*, vol. 183, pp. 1577-84, 2004.
- [88] R. A. JAIN, "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2475-90, 2000.
- [89] F. JAKAB, Z. RATH, F. SCHMAL, P. NAGY, and J. FALLER, "Changes in hepatic hemodynamics due to primary liver tumours," *HPB Surgery*, vol. 9, pp. 245-8, 1996.
- [90] F. JAKAB, Z. RATH, F. SCHMAL, P. NAGY, and J. FALLER, "A new method to measure portal venous and hepatic arterial blood flow in patients intraoperatively," *HPB Surgery*, vol. 9, pp. 239-43, 1996.

- [91] S. JARASWEKIN, S. PRAKONGPAN, and R. BODMEIER, "Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles," *Journal of Microencapsulation*, vol. 24, pp. 117-28, 2007.
- [92] B. JEONG HOON, P. JAE HONG, Y. KI YOUNG, and H. JUNGHO, "Ambient spark generation to synthesize carbon-encapsulated metal nanoparticles in continuous aerosol manner," *Nanoscale*, vol. 1, pp. 339-43, 2009.
- [93] J.-R. JEONG, S.-J. LEE, J.-D. KIM, and S.-C. SHIN, "Magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles with poly(D,L lactide-co-glycolide)," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 40, pp. 3015-3017, 2004.
- [94] T. KALINSKI and A. ROESSNER, "Hepatocellular carcinoma: pathology and liver biopsy," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 102-8, 2009.
- [95] M. KAWASHITA, *et al.*, "In vitro heat generation by ferrimagnetic maghemite microspheres for hyperthermic treatment of cancer under an alternating magnetic field," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, pp. 1897-903, 2008.
- [96] M. KAWASHITA, *et al.*, "Enzymatic preparation of hollow magnetite microspheres for hyperthermic treatment of cancer," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, pp. 605-10, 2006.
- [97] M. KAWASHITA, *et al.*, "Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 2231-8, 2005.
- [98] A. S. KENNEDY, C. KLEINSTREUER, C. A. BASCIANO, and W. A. DEZARN, "Computer modeling of yttrium-90-microsphere transport in the hepatic arterial tree to improve clinical outcomes," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 76, pp. 631-7, 2010.
- [99] J. KETTENBACH, *et al.*, "Drug-loaded microspheres for the treatment of liver cancer: review of current results," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 31, pp. 468-76, 2008.
- [100] M. A. KHAN, *et al.*, "Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma," *Journal of Hepatology*, vol. 32, pp. 792-7, 2000.

- [101] T. L. KLINE, X. YUN-HAO, J. YING, and W. JIAN-PING, "Biocompatible high-moment FeCo-Au magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia treatment optimization," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 1525-8, 2009.
- [102] H. KOBEITER, *et al.*, "Targeted transarterial therapy of Vx-2 rabbit liver tumor with Yttrium-90 labeled ferromagnetic particles using an external magnetic field," *Anticancer Research*, vol. 27, pp. 755-60, 2007.
- [103] D. KODAMA, *et al.*, "Synthesis of Fe-Co alloy particles by modified polyol process," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 42, pp. 2796-8, 2006.
- [104] A. KONYA, K. C. WRIGHT, I. A. SZWARC, and R. D. COLLINS, "Technical aspects of catheter-related interventions in the liver of the rabbit," *Acta radiologica*, vol. 38, pp. 332-4, 1997.
- [105] G. KOU, *et al.*, "Development of SM5-1-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection," *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 374, pp. 192-7, 2008.
- [106] K. M. KRISHNAN, "Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 46, pp. 2523-2558, 2010.
- [107] L. M. KULIK, *et al.*, "Yttrium-90 microspheres (TheraSphere) treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: downstaging to resection, RFA and bridge to transplantation," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 94, pp. 572-86, 2006.
- [108] L. M. KULIK, *et al.*, "Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis," *Hepatology*, vol. 47, pp. 71-81, 2008.
- [109] P. C. KWOK, *et al.*, "A randomized clinical trial comparing autologous blood clot and gelfoam in transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma," *Journal of Hepatology*, vol. 32, pp. 955-64, 2000.
- [110] J. H. LEE, *et al.*, "High-contrast in vivo visualization of microvessels using novel FeCo/GC magnetic nanocrystals," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 62, pp. 1497-509, 2009.

- [111] K. H. LEE, *et al.*, "Considerations for implantation site of VX2 carcinoma into rabbit liver," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 20, pp. 113-7, 2009.
- [112] K. H. LEE, *et al.*, "Distribution of iron oxide-containing Embosphere particles after transcatheter arterial embolization in an animal model of liver cancer: evaluation with MR imaging and implication for therapy," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 19, pp. 1490-6, 2008.
- [113] K. H. LEE, *et al.*, "Doxorubicin-loaded QuadraSphere microspheres: plasma pharmacokinetics and intratumoral drug concentration in an animal model of liver cancer," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 33, pp. 576-82, 2010.
- [114] P. W. LEE, *et al.*, "The characteristics, biodistribution, magnetic resonance imaging and biodegradability of superparamagnetic core-shell nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 1316-24, 2010.
- [115] R. LENCIONI, "Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 52, pp. 762-73, 2010.
- [116] R. LENCIONI, "Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma in the era of molecular targeted therapies," *Oncology*, vol. 78 Suppl 1, pp. 107-12, 2010.
- [117] M. LEVY, *et al.*, "Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of - Fe₂O₃ nanoparticles," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 20, p. 204133 (5 pp.), 2008.
- [118] A. L. LEWIS, *et al.*, "Doxorubicin eluting beads - 1: effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, pp. 1691-9, 2007.
- [119] A. L. LEWIS, *et al.*, "DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 17, pp. 335-42, 2006.
- [120] F. R. LI, W. H. YAN, Y. H. GUO, H. QI, and H. X. ZHOU, "Preparation of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles and study on hyperthermia combined with pharmacotherapy for liver cancer," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 25, pp. 383-91, 2009.

- [121] F. R. LI, W. H. YAN, Y. H. GUO, H. QI, and H. X. ZHOU, "Preparation of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles and study on hyperthermia combined with pharmacotherapy for liver cancer," *Int J Hyperthermia*, vol. 25, pp. 383-91, 2009.
- [122] Z. LI, *et al.*, "Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 10, pp. 1876-80, 2004.
- [123] Z. LI, *et al.*, "Magnetic SiO(2) gel microspheres for arterial embolization hyperthermia," *Biomed Mater*, vol. 5, p. 065010, 2010.
- [124] E. LIAPI, C. C. GEORGIADES, K. HONG, and J. F. GESCHWIND, "Transcatheter arterial chemoembolization: current technique and future promise," *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, vol. 10, pp. 2-11, 2007.
- [125] E. LIAPI and J. F. GESCHWIND, "Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, pp. 978-86, 2007.
- [126] E. LIAPI and J. F. GESCHWIND, "Chemoembolization for primary and metastatic liver cancer," *Cancer Journal*, vol. 16, pp. 156-62, 2010.
- [127] E. LIAPI, K. H. LEE, C. C. GEORGIADES, K. HONG, and J. F. GESCHWIND, "Drug-eluting particles for interventional pharmacology," *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, vol. 10, pp. 261-9, 2007.
- [128] R. LIN, L. SHI NG, and C. H. WANG, "In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4476-85, 2005.
- [129] H. L. LIU, *et al.*, "Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 15205-10, 2010.
- [130] L. LIU, *et al.*, "Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5," *Cancer Research*, vol. 66, pp. 11851-8, 2006.

- [131] J. M. LLOVET and J. BRUIX, "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival," *Hepatology*, vol. 37, pp. 429-42, 2003.
- [132] J. M. LLOVET, *et al.*, "Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 359, pp. 1734-9, 2002.
- [133] J. M. LLOVET, *et al.*, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 359, pp. 378-90, 2008.
- [134] C. M. LO, *et al.*, "Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 35, pp. 1164-71, 2002.
- [135] R. LOPEZ-BENITEZ, *et al.*, "Analysis of nontarget embolization mechanisms during embolization and chemoembolization procedures," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 32, pp. 615-22, 2009.
- [136] P. M. LOPEZ, A. VILLANUEVA, and J. M. LLOVET, "Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 23, pp. 1535-47, 2006.
- [137] A.-H. LU, E. L. SALABAS, and F. SCHUTH, "Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 46, pp. 1222-1244, 2007.
- [138] A. S. LUBBE, *et al.*, "Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy," *Cancer Research*, vol. 56, pp. 4694-701, 1996.
- [139] A. S. LUBBE, *et al.*, "Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors," *Cancer Research*, vol. 56, pp. 4686-93, 1996.
- [140] A. LUCIANI, *et al.*, "Magnetic targeting of iron-oxide-labeled fluorescent hepatoma cells to the liver," *European Radiology*, vol. 19, pp. 1087-96, 2009.

- [141] J. H. MAENG, *et al.*, "Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 4995-5006, 2010.
- [142] A. H. MAHNKEN, P. BRUNERS, and R. W. GUNTHER, "Local ablative therapies in HCC: percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 148-56, 2009.
- [143] K. MALAGARI, *et al.*, "Prospective randomized comparison of chemoembolization with doxorubicin-eluting beads and bland embolization with BeadBlock for hepatocellular carcinoma," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 33, pp. 541-51, 2010.
- [144] G. MALEUX, *et al.*, "Transcatheter chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma: current knowledge and future directions," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 157-63, 2009.
- [145] E. MANOVA, *et al.*, "Mechanochemical synthesis and characterization of nanodimensional iron-cobalt spinel oxides," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 485, pp. 356-61, 2009.
- [146] L. MARELLI, *et al.*, "Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 30, pp. 6-25, 2007.
- [147] L. MARELLI, *et al.*, "Treatment outcomes for hepatocellular carcinoma using chemoembolization in combination with other therapies," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 32, pp. 594-606, 2006.
- [148] E. N. MARIEB, *Anatomie et physiologie humaines*. Saint-Laurent: Editions du nouveau pédagogique, 1992.
- [149] S. MARTEL, *et al.*, "MRI-based medical nanorobotic platform for the control of magnetic nanoparticles and flagellated bacteria for target interventions in human capillaries," *International Journal of Robotics Research*, vol. 28, pp. 1169-82, 2009.
- [150] S. MARTEL, *et al.*, "Automatic navigation of an untethered device in the artery of a living animal using a conventional clinical magnetic resonance imaging system," *Applied Physics Letters*, vol. 90, pp. 114105-1, 2007.

- [151] C. MARTINEZ-BOUBETA, L. BALCELLS, C. MONTY, and B. MARTINEZ, "The effects of exchange bias on Fe-Co/MgO magnetic nanoparticles with core/shell morphology," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 22, p. 026004 (5 pp.), 2010.
- [152] J. B. MATHIEU, G. BEAUDOIN, and S. MARTEL, "Method of propulsion of a ferromagnetic core in the cardiovascular system through magnetic gradients generated by an MRI system," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 53, pp. 292-9, 2006.
- [153] J. B. MATHIEU and S. MARTEL, "Magnetic microparticle steering within the constraints of an MRI system: proof of concept of a novel targeting approach," *Biomedical Microdevices*, vol. 9, pp. 801-8, 2007.
- [154] J. B. MATHIEU and S. MARTEL, "Steering of aggregating magnetic microparticles using propulsion gradients coils in an MRI Scanner," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 63, pp. 1336-45, 2010.
- [155] A. MATSUMOTO, Y. MATSUKAWA, T. SUZUKI, and H. YOSHINO, "Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactide)," *Journal of Controlled Release*, vol. 106, pp. 172-80, 2005.
- [156] C. A. MAURER, *et al.*, "Hepatic artery embolisation with a novel radiopaque polymer causes extended liver necrosis in pigs due to occlusion of the concomitant portal vein," *Journal of Hepatology*, vol. 32, pp. 261-8, 2000.
- [157] R. MAZZANTI, *et al.*, "Treatment of locally advanced hepatocellular carcinoma by hepatic intra-artery chemotherapy: a pilot study," *Digestive and Liver Disease*, vol. 36, pp. 278-85, 2004.
- [158] V. MEIER and G. RAMADORI, "Clinical staging of hepatocellular carcinoma," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 131-41, 2009.
- [159] T. MINAMIMURA, *et al.*, "Tumor regression by inductive hyperthermia combined with hepatic embolization using dextran magnetite-incorporated microspheres in rats," *International Journal of Oncology*, vol. 16, pp. 1153-8, 2000.
- [160] M. MITSUMORI, *et al.*, "Targeted hyperthermia using dextran magnetite complex: a new treatment modality for liver tumors," *Hepatogastroenterology*, vol. 43, pp. 1431-7, 1996.

- [161] K. MOHNIKE, *et al.*, "Image-guided interstitial high-dose-rate brachytherapy in hepatocellular carcinoma," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 170-4, 2009.
- [162] P. L. MOREIRA and Y. H. AN, "Animal models for therapeutic embolization," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 26, pp. 100-10, 2003.
- [163] P. MOROZ, S. K. JONES, and B. N. GRAY, "Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 18, pp. 267-84, 2002.
- [164] P. MOROZ, S. K. JONES, and B. N. GRAY, "Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 80, pp. 149-56, 2002.
- [165] P. MOROZ, S. K. JONES, J. WINTER, and B. N. GRAY, "Targeting liver tumors with hyperthermia: ferromagnetic embolization in a rabbit liver tumor model," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 78, pp. 22-9; discussion 30-1, 2001.
- [166] P. MOROZ, C. METCALF, and B. N. GRAY, "Histologic analysis of liver tissue following hepatic arterial infusion of ferromagnetic particles in a rabbit tumour model," *Biometals*, vol. 16, pp. 455-64, 2003.
- [167] P. MOROZ, *et al.*, "Arterial embolization hyperthermia: hepatic iron particle distribution and its potential determination by magnetic resonance imaging," *Physics in Medicine & Biology*, vol. 47, pp. 1591-602, 2002.
- [168] A. NACEV, C. BENI, O. BRUNO, and B. SHAPIRO, "The behaviors of ferromagnetic nano-particles in and around blood vessels under applied magnetic fields," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 323, pp. 651-668, 2011.
- [169] Y. NAMIKI, *et al.*, "A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, pp. 598-606, 2009.
- [170] J. NAMUR, *et al.*, "MR imaging detection of superparamagnetic iron oxide loaded tris-acryl embolization microspheres," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 18, pp. 1287-95, 2007.

- [171] J. NAMUR, *et al.*, "Drug-eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 21, pp. 259-67, 2010.
- [172] I. O. NG, C. L. LIU, S. T. FAN, and M. NG, "Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 113, pp. 355-63, 2000.
- [173] N. NITTA, *et al.*, "Basic investigation of vascular interventional radiology (IR) using large rabbits," *Experimental Animals*, vol. 58, pp. 557-61, 2009.
- [174] L. N. OKASSA, *et al.*, "Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 67, pp. 31-8, 2007.
- [175] H. PARDOE, P. R. CLARK, T. G. ST PIERRE, P. MOROZ, and S. K. JONES, "A magnetic resonance imaging based method for measurement of tissue iron concentration in liver arterially embolized with ferrimagnetic particles designed for magnetic hyperthermia treatment of tumors," *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 21, pp. 483-8, 2003.
- [176] J. G. PARK, *et al.*, "MDR1 gene expression: its effect on drug resistance to doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cell lines," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 86, pp. 700-5, 1994.
- [177] M. PAVEL and A. STANCU, "Ferromagnetic nanoparticles dose based on tumor size in magnetic fluid hyperthermia cancer therapy," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 45, pp. 5251-4, 2009.
- [178] S. PENG, C. WANG, J. XIE, and S. SUN, "Synthesis and stabilization of monodisperse Fe nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 10676-10677, 2006.
- [179] M. J. PENTECOST, "Transcatheter treatment of hepatic metastases," *American Journal of Roentgenology*, vol. 160, pp. 1171-5, 1993.

- [180] M. P. PILENI, C. PETIT, and Z. L. WANG, "Ferromagnetic cobalt nanocrystals achieved by soft annealing approach-From individual behavior to mesoscopic organized properties," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 312, pp. 390-9, 2007.
- [181] C. PLANK, "Nanomedicine: Silence the target," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, pp. 544-5, 2009.
- [182] B. POLYAK, *et al.*, "High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 698-703, 2008.
- [183] P. POUPONNEAU, O. SAVADOGO, T. NAPPORN, L. YAHIA, and S. MARTEL, "Corrosion study of iron-cobalt alloys for MRI-based propulsion embedded in untethered microdevices operating in the vascular network," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 93, pp. 203-11, 2010.
- [184] C. PRASHANT, *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide--loaded poly(lactic acid)-D-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate copolymer nanoparticles as MRI contrast agent," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 5588-97, 2010.
- [185] S. PURUSHOTHAM, *et al.*, "Thermoresponsive core-shell magnetic nanoparticles for combined modalities of cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 20, p. 305101, 2009.
- [186] S. PURUSHOTHAM and R. V. RAMANUJAN, "Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 502-10, 2010.
- [187] J. QIAN, *et al.*, "Application of poly-lactide-co-glycolide-microspheres in the transarterial chemoembolization in an animal model of hepatocellular carcinoma," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 9, pp. 94-8, 2003.
- [188] J. L. RAOUL, *et al.*, "Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of ¹³¹I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 26, pp. 1156-61, 1997.
- [189] D. K. REYES, *et al.*, "Single-center phase II trial of transarterial chemoembolization with drug-eluting beads for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: initial experience in the United States," *Cancer Journal*, vol. 15, pp. 526-32, 2009.

- [190] T. K. RHEE, *et al.*, "The effect of catheter-directed CT angiography on yttrium-90 radioembolization treatment of hepatocellular carcinoma," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 16, pp. 1085-91, 2005.
- [191] J. RICKE, *et al.*, "Hepatic arterial port systems for treatment of liver metastases: factors affecting patency and adverse events," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 15, pp. 825-33, 2004.
- [192] J. RICKE, *et al.*, "In vivo assessment of the tolerance dose of small liver volumes after single-fraction HDR irradiation," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 62, pp. 776-84, 2005.
- [193] J. RICKE, *et al.*, "CT-guided interstitial brachytherapy of liver malignancies alone or in combination with thermal ablation: phase I-II results of a novel technique," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 58, pp. 1496-505, 2004.
- [194] J. RICKE, *et al.*, "Liver malignancies: CT-guided interstitial brachytherapy in patients with unfavorable lesions for thermal ablation," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 15, pp. 1279-86, 2004.
- [195] J. RIEGLER, *et al.*, "Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 5366-71, 2010.
- [196] I. D. ROSCA, F. WATARI, and M. UO, "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation," *Journal of Controlled Release*, vol. 99, pp. 271-280, 2004.
- [197] S. RUDGE, *et al.*, "Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC)," *Journal of Controlled Release*, vol. 74, pp. 335-40, 2001.
- [198] S. R. RUDGE, T. L. KURTZ, C. R. VESSELY, L. G. CATTERALL, and D. L. WILLIAMSON, "Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1411-1420, 2000.
- [199] B. SANGRO, *et al.*, "Radioembolization using 90Y-resin microspheres for patients with advanced hepatocellular carcinoma," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 66, pp. 792-800, 2006.

- [200] B. SANGRO, *et al.*, "Treatment of hepatocellular carcinoma by radioembolization using ^{90}Y microspheres," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 164-9, 2009.
- [201] B. SANGRO, *et al.*, "Liver disease induced by radioembolization of liver tumors: description and possible risk factors," *Cancer*, vol. 112, pp. 1538-46, 2008.
- [202] K. SATO, *et al.*, "Treatment of unresectable primary and metastatic liver cancer with yttrium-90 microspheres (TheraSphere): assessment of hepatic arterial embolization," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 29, pp. 522-9, 2006.
- [203] D. SCHACHERER, C. GIRLICH, M. E. JUNG, R. WIEST, and J. SCHOLMERICH, "Transabdominal ultrasound with echoenhancement by contrast media in the diagnosis of hepatocellular carcinoma," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 109-13, 2009.
- [204] J. F. SCHENCK, "The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: MRI magnetic compatibility of the first and second kinds," *Medical Physics*, vol. 23, pp. 815-50, 1996.
- [205] K. SCHUTTE, J. BORNSCHEIN, and P. MALFERTHEINER, "Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 80-92, 2009.
- [206] H. G. SEILER, H. SIGEL, and A. SIGEL, Eds., *Handbook on Toxicity of Inorganic compounds*. United States of America: Marcel Dekker, Inc., 1988, p.^pp. Pages.
- [207] A. SENYEI, K. WIDDER, and G. CZERLINSKI, "Magnetic guidance of drug-carrying microspheres," *Journal of Applied Physics*, vol. 49, pp. 3578-3583, 1978.
- [208] W. S. SEO, *et al.*, "FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents," *Nature Materials*, vol. 5, pp. 971-6, 2006.
- [209] J. H. SEPPENWOOLDE, *et al.*, "Fully MR-guided hepatic artery catheterization for selective drug delivery: a feasibility study in pigs," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 23, pp. 123-9, 2006.
- [210] L. W. SEYMOUR, *et al.*, "Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, pp. 1668-76, 2002.

- [211] H. SHANG, W.-S. CHANG, S. KAN, S. A. MAJETICH, and G. U. LEE, "Synthesis and characterization of paramagnetic microparticles through emulsion-templated free radical polymerization," *Langmuir*, vol. 22, pp. 2516-2522, 2006.
- [212] B. SHAPIRO, "Towards dynamic control of magnetic fields to focus magnetic carriers to targets deep inside the body," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 1594-9, 2009.
- [213] M. S. SHIVE and J. M. ANDERSON, "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 28, pp. 5-24, 1997.
- [214] L. A. SILVEIRA, F. B. SILVEIRA, and V. P. FAZAN, "Arterial diameter of the celiac trunk and its branches. Anatomical study," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 24, pp. 43-7, 2009.
- [215] B. SRINIVASAN, *et al.*, "A detection system based on giant magnetoresistive sensors and high-moment magnetic nanoparticles demonstrates Zeptomole sensitivity: potential for personalized medicine," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, pp. 2764-7, 2009.
- [216] S. STAMPFL, *et al.*, "Experimental evaluation of early and long-term effects of microparticle embolization in two different mini-pig models. Part II: liver," *Cardiovascular and Interventional Radiology*, vol. 30, pp. 462-8, 2007.
- [217] J. B. SUN, *et al.*, "Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 101, pp. 1313-20, 2008.
- [218] J. B. SUN, *et al.*, "In vitro and in vivo antitumor effects of doxorubicin loaded with bacterial magnetosomes (DBMs) on H22 cells: the magnetic bio-nanoparticles as drug carriers," *Cancer Letters*, vol. 258, pp. 109-17, 2007.
- [219] J. B. SUN, *et al.*, "Targeted distribution of bacterial magnetosomes isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in healthy Sprague-Dawley rats," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* vol. 9, pp. 1881-5, 2009.

- [220] Y. TANG, *et al.*, "Detection of hepatocellular carcinoma arising in cirrhotic livers: comparison of gadolinium- and ferumoxides-enhanced MR imaging," *American Journal of Roentgenology*, vol. 172, pp. 1547-54, 1999.
- [221] A. TANIMOTO, "Use of SPIOs for Clinical Liver Imaging," in *Nanoparticles in Biomedical Imaging - Emerging Technologies and Applications*, J. W. M. BUTLITE and M. M. J. MODO, Eds., ed New York: Springer, 2008, pp. 41-62.
- [222] A. TANIMOTO, M. MUKAI, and S. KURIBAYASHI, "Evaluation of superparamagnetic iron oxide for MR imaging of liver injury: proton relaxation mechanisms and optimal MR imaging parameters," *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, vol. 5, pp. 89-98, 2006.
- [223] R. R. TAYLOR, Y. TANG, V. M. GONZALES, P. W. STRATFORD, and A. L. LEWIS, "Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: *in vitro* and *in vivo* evaluation of drug release properties," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 30, pp. 7-14, 2007.
- [224] S. S. THORGEIRSSON and J. W. GRISHAM, "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma," *Nat Genet*, vol. 31, pp. 339-46, 2002.
- [225] R. TIETZE, *et al.*, "Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after *in vivo* administration," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 1465-8, 2009.
- [226] H. TOKORO, S. FUJII, and T. OKU, "Iron nanoparticles coated with graphite nanolayers and carbon nanotubes," *Diamond and Related Materials*, vol. 13, pp. 1270-1273, 2004.
- [227] N. TSAFNAT, G. TSAFNAT, T. D. LAMBERT, and S. K. JONES, "Modelling heating of liver tumours with heterogeneous magnetic microsphere deposition," *Physics in Medicine & Biology*, vol. 50, pp. 2937-53, 2005.
- [228] A. J. VANDER, J. H. SHERMAN, L. D. S., and R. BRIÈRE, *Physiologie humaine*, 3^{ième} ed. Montréal: Chenelière/McGraw-Hill, 1995.
- [229] M. VARELA, *et al.*, "Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics," *Journal of Hepatology*, vol. 46, pp. 474-81, 2007.

- [230] M. VARELA, M. SALA, J. M. LLOVET, and J. BRUIX, "Treatment of hepatocellular carcinoma: is there an optimal strategy?," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 29, pp. 99-104, 2003.
- [231] M. A. VENTE, *et al.*, "Holmium-166 poly(L-lactic acid) microsphere radioembolisation of the liver: technical aspects studied in a large animal model," *European Radiology*, vol. 20, pp. 862-9, 2010.
- [232] A. VILLANUEVA, P. NEWELL, D. Y. CHIANG, S. L. FRIEDMAN, and J. M. LLOVET, "Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma," *Seminars in Liver Disease*, vol. 27, pp. 55-76, 2007.
- [233] T. J. VOGL, *et al.*, "Magnetic resonance imaging of focal liver lesions. Comparison of the superparamagnetic iron oxide resovist versus gadolinium-DTPA in the same patient," *Investigative Radiology*, vol. 31, pp. 696-708, 1996.
- [234] T. J. VOGL, *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide--enhanced versus gadolinium-enhanced MR imaging for differential diagnosis of focal liver lesions," *Radiology*, vol. 198, pp. 881-7, 1996.
- [235] C. WANG, S. PENG, L.-M. LACROIX, and S. SUN, "Synthesis of high magnetic moment CoFe nanoparticles via interfacial diffusion in core/shell structured Co/Fe nanoparticles," *Nano Research*, vol. 2, pp. 380-385, 2009.
- [236] J. WARD, *et al.*, "Liver metastases in candidates for hepatic resection: comparison of helical CT and gadolinium- and SPIO-enhanced MR imaging," *Radiology*, vol. 237, pp. 170-80, 2005.
- [237] R. A. WASSEL, B. GRADY, R. D. KOPKE, and K. J. DORMER, "Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 292, pp. 125-130, 2007.
- [238] B. D. WEINBERG, *et al.*, "Combined radiofrequency ablation and doxorubicin-eluting polymer implants for liver cancer treatment," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 81, pp. 205-13, 2007.

- [239] K. J. WIDDER, R. M. MORRIS, G. POORE, D. P. HOWARD, JR., and A. E. SENYEI, "Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, pp. 579-81, 1981.
- [240] S. M. WILHELM, *et al.*, "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 64, pp. 7099-109, 2004.
- [241] M. W. WILSON, *et al.*, "Hepatocellular carcinoma: regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/ conventional angiography suite--initial experience with four patients," *Radiology*, vol. 230, pp. 287-93, 2004.
- [242] C. WISCHKE and S. P. SCHWENDEMAN, "Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 364, pp. 298-327, 2008.
- [243] M. A. WORNIS, A. WEINMANN, M. SCHUCHMANN, and P. R. GALLE, "Systemic therapies in hepatocellular carcinoma," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 175-88, 2009.
- [244] M. YAMADA, S.-J. OKUMURA, and K. TAKAHASHI, "Synthesis and film formation of magnetic feco nanoparticles with graphitic carbon shells," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 1, pp. 2042-2045, 2010.
- [245] X. YANG, *et al.*, "Cobalt nanoparticles coated with graphitic shells as localized radio frequency absorbers for cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 19, p. 435102 (9 pp.), 2008.
- [246] C. YIWEN, Z. PENG, H. JIANGHUA, Y. WULI, and W. CHANGCHUN, "Synthesis of monodispersed Co(Fe)/carbon nanocomposite microspheres with very high saturation magnetization," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, pp. 4047-52, 2009.
- [247] C. J. ZECH, M. F. REISER, and K. A. HERRMANN, "Imaging of hepatocellular carcinoma by computed tomography and magnetic resonance imaging: state of the art," *Digestive Diseases*, vol. 27, pp. 114-24, 2009.
- [248] B. S. ZOLNIK and D. J. BURGESS, "Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release," *Journal of Controlled Release*, vol. 122, pp. 338-44, 2007.

ANNEXE 1 – APPROBATION DU PROTOCOLE ANIMAL PAR LES COMITÉS D'ÉTHIQUE



CERTIFICAT D'ACCEPTATION D'UN PROJET DE RECHERCHE AVEC DES ANIMAUX

Le 16 juin 2008

M. Sylvain Martel
Département de génie informatique
École Polytechnique de Montréal

N/Réf : Dossier ANI-07/08-03

Adresse civique :

Campus de l'Université de Montréal
2905, boul. Édouard-Montpetit
École Polytechnique
2500, chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J4

Adresse postale :

C.P. 6079, succursale Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3A7

Téléphone : (514) 340-4860
Télécopieur : (514) 340-4992

Cher Monsieur Martel,

J'ai le plaisir de vous informer que nous avons reçu tous les documents de conformité éthique relatifs au projet intitulé « *Tracking of magnetic carriers by mi-gradient for selective chemoembolization of liver tumors : feasibility study* » (subvention IRSC # 179495) que vous réalisez en collaboration avec le Dr. Gilles Soulez de l'Hôpital Notre-Dame de Montréal.

Ce projet pourra par conséquent débiter suite à l'obtention du certificat d'acceptation d'un projet de recherche avec des risques biologiques de l'hôpital Notre-Dame de Montréal et de l'École Polytechnique de Montréal.

Il est entendu que le présent certificat est valable pour le projet tel que soumis au Comité institutionnel de protection des animaux de l'hôpital Notre-Dame de Montréal où se dérouleront les travaux. Le soussigné devra être informé de toute modification qui pourrait être apportée ultérieurement au protocole expérimental, de même que de tout problème imprévu pouvant survenir dans le cadre de ce projet de recherche.

Nous vous prions également de nous faire parvenir **un bref rapport annuel** ainsi que tous les avis de renouvellement du certificat que vous avez soumis initialement pour ce projet ainsi qu'un avis à la fin de vos travaux de recherche.

Je vous souhaite bonne chance dans vos travaux de recherche,

Céline Roehrig, M.A.
Coordonnatrice administrative
Recherche avec des animaux

c.c. : Gilles Savard, DRI
Brigitte Coté, service des finances
Jean-Pierre Labelle, BRCDT
Richard Bisson, BRCDT

COMITÉ INSTITUTIONNEL DE PROTECTION DES ANIMAUX

Téléphone : (514) 890-8000 poste 28947 Télécopieur : (514) 412-7769

Montréal, le 13 août 2010

Dr Gilles Soulez
Centre de recherche
Pavillon Lachapelle, A-1011
Hôpital Notre-Dame du CHUM

Objet : N08007GSI Therapeutic magnetic micro carriers steered by MRI-gradient for liver chemoembolization

(modification 1 sur renouvellement 2)

Dr Soulez,

Nous vous informons par la présente que votre de modification au protocole ci haut mentionné a été soumis aux membres du CIPA qui l'on approuvé en date du 12 août 2010. À cet effet, vous recevrez la copie signée de votre protocole après la réunion du prochain CIPA.

Nous vous rappelons qu'il est de votre responsabilité de transmettre les informations du protocole à tous les utilisateurs. Nous espérons que vous obtiendrez les résultats escomptés dans votre projet et vous prions de croire, Dr Soulez, en l'expression de nos salutations distinguées.

La présidente du CIPA



Suhayla Mukaddam-Daher
SMD/gl

CC. Jocelyne Lavoie
Pj. Protocole anesthésique

ANNEXE 2 – CONTRIBUTION DES COAUTEURS

[illegible]

